

**PENGARUH *Alpinia galanga* (LENGKUAS)
TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL DAN
INDEKS APOPTOSIS PADA ADENOKARSINOMA
MAMMA MENCIT C3H**

***THE EFFECTS OF *Alpinia galanga* (LENGKUAS)
ON THE CELL PROLIFERATION ACTIVITIES AND
APOPTOTIC INDEX OF BREAST ADENOCARCINOMA
C3H MICE***



Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2
dan memperoleh keahlian dalam bidang Patologi Anatomi

Nani Widjaja Budi Hartono

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
PATOLOGI ANATOMI
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2009**

TESIS

**PENGARUH *Alpinia galanga* (LENGKUAS)
TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL DAN
INDEKS APOPTOSIS PADA ADENOKARSINOMA
MAMMA MENCIT C3H**

Disusun oleh:

Nani Widjaja Budi Hartono

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 27 Agustus 2009
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Indra Wijaya, SpPA(K)
NIP. 130 516 878

dr. Noor Wijayahadi, MKes, PhD
NIP. 132 149 104

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran UNDIP

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana UNDIP

dr. Indra Wijaya, SpPA(K)
NIP. 130 516 878

Dr. dr. Winarto, SpMK, SpM
NIP. 130 675 157

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelas kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Mei 2009

Nani Widjaja Budi Hartono

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Nani Widjaja Budi Hartono
NIM : G3K006091
Tempat / Tanggal Lahir : Semarang / 22 Mei 1967
Agama : Katholik
Jenis Kelamin : Perempuan
Alamat : Semarang Indah C XX No. 10 Semarang

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Christus Rex Semarang : Lulus tahun 1979
2. SMP St. Anna Semarang : Lulus tahun 1982
3. SMA Sedes Sapientiae Semarang : Lulus tahun 1985
4. FK Unisula Semarang : Lulus tahun 1993
5. PPDS I Patologi Anagomi FK UNDIP Semarang
6. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP Semarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PTT, Puskesmas Purwodadi Kabupaten Purworejo (1994-1997)
2. Dokter di RS St. Elisabeth Semarang (1998 – Sekarang)
 - Dokter UGD (1998 – 2001)
 - Dokter ICU (2001 – 2006)
 - Tugas belajar di PA FK UNDIP Semarang

D. Riwayat Keluarga

Nama Orang tua :

- a. Nama Ayah : Budi Hartono
- b. Nama Ibu : Indrawati

Nama Suami : dr. Susanto Winarko

Nama Anak : 1. Maria Aurelia
2. Stefanus Andrew

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan YME atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul **“Pengaruh *Alpinia galanga* (Lengkuas) Terhadap Aktivitas Proliferasi sel dan Indeks Apoptosis pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H”**.

Penelitian ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi serta Program Pendidikan Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Penulis berharap penelitian yang telah dilakukan ini dapat dijadikan dasar untuk penulisan selanjutnya dan memberikan manfaat dalam pengembangan terapi kanker payudara. Pada kesempatan yang baik ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, SpAnd(K) selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. dr. Soejoto, SpKK(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
3. Prof. Drs. Y. Warella MPA, PhD, ketua Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
4. Dr. dr. Winarto, SpMK, SpM selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
5. dr. Indra Wijaya, SpPA(K), selaku Ketua Program Studi PPDS I Patologi Anatomi sekaligus sebagai pembimbing, yang telah memberi perhatian, masukan dan saran selama proses persiapan proposal, seminar, pelaksanaan penelitian hingga akhir penelitian tesis ini.
6. dr. Noor Wijayahadi, MKes, PhD selaku pembimbing yang telah memberi perhatian, masukan, saran serta menyediakan waktu selama proses persiapan proposal, seminar, pelaksanaan penelitian hingga akhir penelitian tesis ini.

7. Para penguji dan narasumber Dr. Dra Henna Rya Sunoko, Apt, MES, Drg Henry Setiawan, M.Sc atas masukan dan saran perbaikan untuk kesempurnaan tesis ini.
8. Yayasan dan Direksi RS St. Elisabeth Semarang yang telah memberi kesempatan saya untuk melanjutkan pendidikan S2 dan pendidikan dokter spesialis, serta segala bantuan, dorongan, fasilitas yang tak dapat dihitung baik moril maupun material selama saya studi dan menyusun tesis ini.
9. dr. Bambang Endro Putranto, SpPA(K) selaku Ketua Bagian Patologi Anatomi FK UNDIP yang memberi kesempatan dan bimbingan selama studi di Patologi Anatomi.
10. dr. Kasno, SpPA(K) yang banyak membantu dan memberi bimbingan selama penelitian hingga terselesainya tesis ini.
11. dr. Ika Pawitra Miranti, MKes, SpPA yang telah banyak membantu dan memberi masukan selama penelitian dan selesainya tesis.
12. dr. Udadi Sadhana, MKes, SpPA yang memberi masukan dan saran selama penyusunan tesis ini.
13. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC yang telah membimbing, memberi masukan, saran dan dorongan moril agar cepat menyelesaikan tesis kami.
14. Prof. dr. Soebowo, SpPA(K) atas bimbingan, masukan dan saran selama penyusunan proposal hingga terselesainya tesis ini
15. Prof. Dr. dr. Sarjadi, SpPA(K) atas masukan dan saran untuk kesempurnaan tesis ini.
16. dr. Siti Amarwati Yulianto, SpPA(K) yang selalu memberi semangat, masukan dan saran selama penyusunan hingga selesainya tesis ini.
17. dr. Noor Yazid AD, SpPA(K) yang telah memberi masukan hingga terselesainya tesis ini.
18. Semua rekan sejawat dr Dody Novrial SpPA, dr Hidayat, dr Mujahid, dr Vega, dr Soemarno, dr Andika, dr Devia, dr Meira, dan seluruh karyawan di bagian Patologi Anatomi FK Undip yang telah banyak membantu selama pembuatan tesis ini.

19. Suami saya, dr. Susanto Winarko dan kedua anak saya Aurelia dan Andrew atas pengertian, kesabaran dan dorongan selama saya studi.

Penulis menyadari banyak kekurangan yang terdapat dalam penulisan tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan masukan dari berbagai pihak agar tercapainya sebuah tulisan ilmiah yang bermanfaat.

Akhir kata, penulis mohon maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan, sengaja maupun tidak sengaja baik itu perkataan dan perbuatan yang kami lakukan selama kami menyelesaikan tesis ini.

Semarang, Mei 2009

Nani Widjaja Budi Hartono

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
SINGKATAN	xvi
ABSTRAK	xvii
ABSTRACT	xviii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Penelitian Terdahulu mengenai Lengkuas	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 9
2.1 Lengkuas (<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd)	9
2.2 Proliferasi, apoptosis, dan differensiasi dalam meregulasi sel	 13

2.3	Siklus sel	14
2.4	Apoptosis	16
2.5	Onkogen dari sel tumor	21
2.6	Mekanisme Inflamasi menyebabkan karsinogenesis	22
2.7	Klasifikasi	23
2.8	Etiologi dan Patogenesis	24
2.9	Ki67	26
2.10	Tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) assay	27
2.11	Target molekular terapi herbal untuk prevensi dan terapi kanker	28

BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP

DAN HIPOTESIS	30
3.1 Kerangka Teori	30
3.2 Kerangka Konsep	31
3.3 Hipotesis	31

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian	32
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian	32
4.4. Populasi dan Sampel Penelitian	32
4.4.1 Populasi Penelitian	32
4.4.2 Sampel Penelitian	33
4.4.2.1 Besar Sampel	33
4.4.2.2 Cara Pengambilan Sampel	33

4.5	Variabel Penelitian	34
4.5.1	Variabel Bebas	34
4.5.2	Variabel Tergantung	34
4.6	Bahan dan Alat	34
4.6.1	Bahan	34
4.6.2	Alat	35
4.7	Alur Kerja	37
4.8	Cara Kerja	38
4.9	Definisi Operasional	39
4.10	Analisa Data	41
BAB V	HASIL PENELITIAN	42
5.1	Ekstraksi ekstrak etil asetat <i>Alpinia galanga</i> (rimpang lengkuas)	42
5.2	Inokulasi sel adenokarsinoma mamma	44
5.3	Indeks apoptosis semua mencit yang mendapatkan <i>Alpinia galanga</i> (<i>Intention to treat analysis</i> /waktu kematian mencit diabaikan)	45
5.4	Aktivitas proliferasi semua mencit yang mendapatkan <i>Alpinia galanga</i> (<i>Intention to treat analysis</i> / waktu kematian mencit diabaikan)	47
5.5	Perbedaan indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (<i>Per Protocol Analysis</i>)	49
5.6	Gambaran mikroskopik hasil penelitian	54
5.7	Evaluasi efek samping <i>Alpinia galanga</i> pada organ gaster, ren dan hepar	56

5.8 Berat badan dan volume tumor mencit	60
5.9 Grading Tumor	61
5.10 Penghitungan LD50	62
5.11 Perhitungan nilai <i>Kappa (k)</i>	63
BAB VI PEMBAHASAN	64
6.1 Inokulasi sel adenokarsinoma mamma	65
6.2 Pengaruh pemberian Ekstrak <i>Alpinia galanga</i> terhadap indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H	65
6.3 Evaluasi organ gaster, ren dan hepar untuk mengetahui efek toksisitas ekstrak <i>Alpinia galanga</i>	71
6.4 Nilai <i>Kappa (k)</i>	72
6.5 Grading tumor dan volume tumor.....	73
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	74
7.1 Simpulan	74
7.2 Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	83

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.a Jumlah sampel pada awal sampai akhir penelitian.....	42
5.b Grafik Survival analisis.....	43
5.2 Rerata volume setelah 7 hari inokulasi	44
5.3.1 Indeks apoptosis semua mencit (<i>Intention to treat analysis</i> / waktu kematian mencit diabaikan)	45
5.3.2 Rerata Indeks apoptosis semua mencit (<i>Intention to treat analysis</i> / waktu kematian mencit diabaikan)	46
5.3.3 Hasil uji beda indeks apoptosis(<i>Intention to treat analysis</i>)	46
5.4.1 Aktivitas proliferasi semua mencit (<i>Intention to treat analysis</i> /waktu kematian mencit diabaikan)	47
5.4.2 Rerata Aktivitas proliferasi semua mencit (<i>Intention to treat analysis</i> / waktu kematian mencit diabaikan)	48
5.4.3 Hasil uji beda aktivitas proliferasi (<i>Intention to treat analysis</i>).....	48
5.5.1 Indeks apoptosis pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (<i>Per Protocol Analysis</i>)	50
5.5.2 Rerata Indeks apoptosis pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (<i>Per Protocol Analysis</i>)	51
5.5.3 Hasil uji beda indeks apoptosis(<i>Per Protocol Analysis</i>).....	52
5.5.4 Aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (<i>Per Protocol Analysis</i>)	52
5.5.5 Rerata Aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (<i>Per Protocol Analysis</i>)	53

5.7	Efek samping pada organ Gaster, Ren dan Hepar	57
5.8.1	Perbedaan rerata (\pm sd) berat badan (g) dari awal sampai akhir penelitian	60
5.8.2	Perbedaan volume tumor (satuan mm ³) dari awal sampai akhir penelitian	61
5.9	Rerata grading tumor	61
5.10.1	Persentase kematian mencit untuk menentukan LD50	62
5.10.2	Analisa probit pada penentuan LD50	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Siklus Sel	16
2.2 Jalur apoptosis	18
2.3 Jalur ekstrinsik apoptosis	19
2.4 Jalur intrinsik apoptosis	21
4.1 <i>ALLRED SCORING</i>	39
5.1 Grafik Survival analisis	43
5.6.1 Pewarnaan imunohistokimia untuk sel apoptosis menggunakan Tunel.	54
5.6.2 Pewarnaan Imunohistokimia sel Proliferasi menggunakan Ki67	55
5.7.1 Efek samping di Gaster	57
5.7.2 Efek samping di Hepar	58
5.7.3 Efek samping di Ren	59

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Ethical Clearance	83
Lampiran 2 Surat Ijin Pelaksanaan Penelitian (SIP) di FK UI	84
Lampiran 3 Ekstraksi Alpinia galanga	85
Lampiran 4 Prosedur Inokulasi tumor	86
Lampiran 5 Penatalaksanaan Jaringan	87
Lampiran 6 Pewarnaan jaringan dengan HE	88
Lampiran 7 Pewarnaan sel proliferasi dengan Ki-67	90
Lampiran 8 Pewarnaan sel Apoptosis dengan Tunel	92
Lampiran 9 Penilaian derajat histologik menggunakan metode semikuantitatif dari Elston dan Ellis	93
Lampiran 10 Evaluasi organ gaster	94
Lampiran 11 Evaluasi organ hepar	95
Lampiran 12 Evaluasi organ ginjal	96
Lampiran 13 Lampiran Hasil Analisa Statistik	97
Lampiran 14 Hasil Penelitian.....	127

SINGKATAN

ACA	= 1'acetoxy chavicol acetate (Ekstrak lengkuas)
AIF	= Apoptosis Initiating Factor (AIF)
CD	= Cluster of Differentiation
CDK	= Cyclin Dependent Kinase
CDKs	= Cyclins dependent kinase
CKIs	= Cyclin-dependent kinase inhibitor
COX-2	= Cyclooxygenase-2
DNA	= Deoxynucleotida acid
DPPH	= 1,1-diphenil-2-picrylhydrazil
FADD	= Fas-Associated Death Domain
FasL	= fas ligand
LPS	= Lipopolysaccharide
MAPK	= Mitogen-Activated Protein Kinase
MIB-1	= monoclonal antibody
NF- κ B	= Nuclear Factor Kappa B
NO	= Nitric Oxide
ODC	= Ornithine Decarboxylase
PGH ₂	= Prostaglandin H2
PTPC	= Permeabilitas Transition Pore Complex PTPC
SSAT	= Spermidine/spermin N'acetyltransferase
TNF	= Tumor Necrosis Factor
TUNEL	= Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling
WHO	= World Health Organization WHO

ABSTRAK

Latar belakang: Gangguan keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis menyebabkan perkembangan dan progresi tumor. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd) mengandung 1' *acetoxyl chavicol acetate* (ACA). Penelitian terdahulu ACA menunjukan sebagai antikanker, melalui anti inflamasi, menginduksi apoptosis dan menghambat aktivitas proliferasi. Tujuan penelitian untuk membuktikan pengaruh dosis bertingkat ekstrak *Alpinia galanga* terhadap aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis adenokarsinoma mamma.

Metode : Penelitian eksperimental hewan coba, dengan desain *randomized post test only control group*. Sampel 28 ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor, dibagi 4 kelompok: kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan yang diberi ekstrak *Alpinia galanga* dosis bertingkat (225 mg/KgBB/hari, 450 mg KgBB/hari , 750 mgKg BB/hari) selama 2 minggu. Tumor dilakukan pemeriksaan aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis. Indeks apoptosis dievaluasi dengan metode TUNEL. Aktivitas proliferasi dievaluasi dengan menggunakan *Allred scoring* dengan imunohistokimia Ki-67. Analisis statistik dengan uji nonparametrik *Kruska- Wallis* dilanjutkan uji *Mann- Whitney*.

Hasil: Terdapat perbedaan bermakna aktivitas proliferasi ($p=0,017$) ketiga kelompok yang diberikan ekstrak *Alpinia galanga* dibandingkan Kontrol. ($P_1=21,71 \pm 19,01$, $P_2=13,17 \pm 11,77$, $P_3=6,71 \pm 10,87$, $K=37,43 \pm 15,49$) Penghambatan aktivitas proliferasi dimulai pada dosis 450mg/kgBB/hari, peningkatan dosis diikuti penurunan aktivitas proliferasi. Terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis ($p=0,011$) pada ketiga kelompok yang diberikan ekstrak *Alpinia galanga* dibandingkan kontrol. ($P_1=2,70 \pm 1,81$, $P_2=1,17 \pm 1,08$, $P_3=1,07 \pm 1,44$). Induksi apoptosis dimulai pada dosis 225 mg/KgBB/hari. Peningkatan dosis tidak diikuti peningkatan indeks apoptosis. Tiga belas ekor mencit mati, maka dilakukan analisa penyebab kematian, didapatkan toksisitas di ginjal.

Kesimpulan : Pemberian ekstrak *Alpinia galanga* dapat menginduksi apoptosis dan menurunkan aktivitas proliferasi.

Kata kunci : *Alpinia galanga*, proliferasi, indeks apoptosis, adenokarsinoma mamma.

ABSTRACT

Background: The imbalance between apoptosis and cell proliferation may lead to the progression of tumor growth. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd) which contain ACA (*1' acetoxyl chavicol acetate*) had been reported to have anticancer capability on the previous studies through anti inflammation, inducing apoptosis as well as reducing cellular proliferation. The aim of this study is to investigate the effects of *Alpinia galanga* extract given in gradual dosage on the proliferation activity and apoptotic index of the breast cancer cells.

Method : Animal experiment using randomized post test only control group design was done. Twenty-eight C3H mice were inoculated with tumor and were divided into four groups: One control group and three groups administrated by the extract of *Alpinia galanga* in gradual dosage (225 mg/Kg BW/day, 450 mg/Kg BW/day and 750 mg /Kg BW/day). All of the groups were treated for two weeks. The tumor apoptotic index was evaluated with Tunel method, and the proliferation activities were determined using *Allred scoring* and Ki-67 immunohistochemical staining. Non parametric Kruskal Wallis continued with *Mann-Whitney* tests were used to analyze the data.

Result : There were significant differences on the proliferation activity ($p=0.017$) between three groups administered with *Alpinia galanga* extract compared with control group ($P_1=21.71 \pm 19.01$; $P_2=13.17 \pm 11.77$; $P_3=6.71 \pm 10.87$; $K=37.43 \pm 15.49$) respectively. The disruption of proliferation activity was found on the dosage of 450 mg/Kg BW/day. The increasing dosage was followed by the reduction of proliferation activities. There were significant differences of the apoptotic index ($p=0.011$) of the three groups given *Alpinia galanga* extract compared with control group ($P_1=2.70 \pm 1.81$; $P_2=1.17 \pm 1.08$; $P_3=1.07 \pm 1.44$) respectively. The induction of apoptotic index was started on the dosage of 225 mg/Kg BW/day. Increasing of the dosage was not followed by increasing apoptotic index. Thirteen mice were dead and suggested due to nephrotoxicity.

Conclusion: *Alpinia galanga* extract can induce apoptotic index and reduce proliferation activities.

Keywords : *Alpinia galanga*, proliferation, apoptotic index, adenocarcinoma of the breast.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara penyebab kematian tersering pada wanita di dunia, dengan angka kejadian lebih dari 1.000.000 kasus setiap tahunnya. Di Amerika Serikat setiap tahunnya terdiagnosa 100.000 kanker payudara baru, dengan 30.000 pasien meninggal.¹ Data kanker di Indonesia (*cancer registration in Indonesia*) tahun 1994 oleh Sarjadi, kanker payudara menempati urutan kedua terbanyak pada wanita setelah kanker serviks, didapatkan 2743 kasus dari 14.820 kasus kanker pada wanita. Data kanker di Semarang dan sekitarnya tahun 1994-1998 oleh Sarjadi kanker payudara menempati urutan kedua.^{2,3} Data Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia tentang kanker di Indonesia tahun 2001 berdasarkan data histopatologik, menunjukkan kanker payudara pada perempuan menempati urutan ke-2 dari 10 tumor tersering menurut tumor primer pada perempuan, dengan jumlah 2049.⁴

Populasi sel atau homeostasis jaringan ditentukan oleh kecepatan proliferasi sel, differensiasi dan apoptosis. Tiap sel mempunyai mekanisme pengawasan supaya sel selalu konstan untuk menjaga kestabilan integritas dengan genomnya. Bila terjadi mutasi onkogen maka akan terjadi mekanisme untuk membatasi perluasan atau memperbanyak sel, dengan

penekanan proliferasi dan meningkatkan (*triggering*) apoptosis. Gangguan keseimbangan antara apoptosis dan proliferasi adalah faktor penting untuk terjadinya perkembangan dari tumor (tumorigenesis) dan progresi tumor.^{5,6,7}

Perkembangan payudara normal dikontrol oleh keseimbangan antara proliferasi sel dan apoptosis. Pertumbuhan tumor dapat terjadi karena proliferasi yang tak terkontrol dan berkurangnya apoptosis.^{8,9}

Proliferasi sel adalah pembelahan sel (*cell division*) dan pertumbuhan sel (*cell growth*). Yang mendasari mekanisme dan pengaturan proliferasi sel adalah siklus sel.¹⁰ Aktivitas proliferasi sel dapat dideteksi menggunakan pengecatan immunohistokimia Ki-67, yang akan mengekspresikan tiap fase pada siklus sel kecuali G0.^{11,12,13}

Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Sel apoptosis mempunyai bentuk kondensasi kromatin, penyusutan sel (*shrinkage*), fragmentasi nukleus dan dikelilingi oleh halo yang jernih. Sel apoptosis dapat dilihat secara mikroskopis, melalui prosesing jaringan rutin yang kemudian dilakukan pengecatan H&E dan pengecatan imunohistokimia Tunel.^{7,8,9,10}

Penilaian proliferasi dan apoptosis dapat untuk mengevaluasi pertumbuhan atau pengurangan massa tumor terhadap respon kemoterapi, radioterapi dan akhir-akhir ini dengan terapi hormonal.^{12,14,15} Terapi kanker payudara meliputi pembedahan, radiasi, hormonal dan kemoterapi.¹ Terapi tersebut seringkali tidak terjangkau oleh masyarakat, maka dicari obat

tradisional untuk pengobatan kanker. Ada beberapa kelebihan penggunaan obat tradisional, harganya lebih murah karena dapat dibudidayakan, mudah didapat dan diharapkan efek samping lebih minimal dibanding obat antikanker sintetik.¹⁷

Salah satu tanaman yang diketahui untuk terapi antikanker dengan meningkatkan apoptosis dan menghambat proliferasi adalah lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd)). Lengkuas mengandung 1' *acetoxyl chavicol acetate* (ACA). Penelitian terdahulu ACA berfungsi sebagai antikanker, melalui anti inflamasi, menginduksi apoptosis dan menghambat aktivitas proliferasi. Lengkuas termasuk dalam famili *Zingiberaceae*, kelas *rhizome* sering digunakan sebagai bumbu penyedap masakan atau rempah, mempunyai aroma harum dan rasa yang pedas. Selain untuk penyedap juga digunakan untuk obat tradisional antara lain dapat untuk mengobati gangguan lambung, menghilangkan kembung, anti jamur, menghilangkan gatal, menambah nafsu makan, demam dan sakit tenggorokan. Akhir-akhir ini digunakan sebagai pengobatan dan pencegahan (*chemoprevention*) kanker.^{17,18,19,21}

Dari beberapa penelitian, diantaranya Rusmarilin membuktikan ekstrak etil asetat lengkuas menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia. Penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel yang hidup dalam kultur dengan hemositometer. Mekanisme penghambatan diduga karena apoptosis. Ekstrak etil asetat lengkuas 100 µg/ml

menghambat 100% proliferasi sel kanker paru (A 549) dan pada konsentrasi 50 µg/ml terjadi penghambatan terendah 95%. Pada konsentrasi 200µg/ml terjadi penghambatan tertinggi pada sel kanker primer dari kanker ovarium adenokarsinoma papilar serosa sebesar 76,36% dan konsentrasi 50µg/ml terjadi penghambatan terendah 41,82% pada. Pada penelitian mencit yang ditransplantasi dengan sel kanker mamma, memberi gambaran makroskopis dan mikroskopis lebih baik pada dosis 750mg/kg BB. Uji toksisitas invivo perhitungan LD50 pada konsentrasi 765 mg/kgBB.^{17,18,19}

Beberapa penelitian dengan menggunakan binatang coba maupun kultur sel, menunjukkan efek ACA yang terkandung dalam Lengkuas *Alpinia Galanga* (L.) Willd mempunyai potensi untuk menurunkan angka kejadian kanker yang diinduksi oleh karsinogen. Fungsi ACA diantaranya adalah meningkatkan apoptosis, menghambat proliferasi, mencegah inflamasi (Nitric Oxide, menghambat COX2) dan menghilangkan radikal bebas,. Inflamasi adalah fenomena patofisiologi dari beberapa penyakit, termasuk perkembangan neoplasma.^{17,20,,21,23,24}

Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekstrak etil asetat Lengkuas dapat berperan sebagai antikanker, melalui penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis. Untuk mengetahui dosis yang terbaik penghambatan proliferasi dan induksi apoptosis pada mencit C3H yang diinokulasi sel tumor adenokarsinoma mamma dengan toksisitas minimal maka digunakan dosis bertingkat ekstrak etil asetat lengkuas, yaitu 225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari. Aktivitas proliferasi sel dinilai

dengan pengecatan immunohistokimia Ki67, yang akan mengekspresikan sel yang berproliferasi pada fase G1,S,G2,M kecuali G0, kemudian dilakukan penghitungan dengan *Allred scoring*. Apoptosis dinilai dengan menggunakan Tunel yang melabel sel yang mengalami fragmentasi DNA, kemudian dilakukan perhitungan indeks apoptosis.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H yang diberi ekstrak lengkuas dengan dosis bertingkat?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan adanya perbedaan aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H yang diberi ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis bertingkat 225mg/kgBB/hari,450mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Menghitung skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H yang diberi ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis 225mg/kgBB/hari, 450mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari.

1.3.2.2 Menghitung skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H yang tidak diberi ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*).

1.3.2.3 Menganalisa perbedaan skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H antarkelompok yang diberi ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis bertingkat 225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari.

1.4 Manfaat Penelitian

Ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) terbukti menghambat aktivitas proliferasi dan meningkatkan indeks apoptosis, maka lengkuas (*Alpinia galanga*) dapat digunakan sebagai terapi adjuvan pada kanker, terutama kanker mamma.

1.5 Penelitian Terdahulu mengenai Lengkuas

Nama	Tahun	Metode	Populasi	Hasil penelitian
Rusmarilin. H ⁽¹⁴⁾ Disertasi, IPB,Bogor	2003	Eksperi- mental	- <i>Cell line</i> : Sel kanker paru/ A 549, leuke-mia/K 562, primary mela-noma/A 375 , hela (kanker serviks) - 42 Mencit C3H yang ditransplantasi sel	- menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur maupun sel kanker primer manusia, penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel yang hidup dalam kultur dengan hemositometer. - Dosis 750 mg/kg BB/hari memberikan gambaran

			kanker <i>compact tubular carcinoma</i> , dibagi menjadi 7 kelompok diberi perlakuan ekstrak lengkuas 50mg/kgBB 100mg/kgBB/hari 250mg/kgBB/hari 500mg/kgBB/hari 750mg/kgBB/hari 1000mg/kgBB/hari dan kontrol	makroskopis dan mikroskopis lebih baik dan pada dosis 50 mg/kgBB/hari paling baik dalam menghambat pertumbuhan kanker karsinoma tubular padat.
Morikawa. T. dkk ⁽¹⁹⁾ (Pharmaceutical soc of japan 2005	2005	Eksperimental	<i>Mouse peritoneal macrophage</i>	Penghambatan inflamasi melalui penghambatan <i>Nitric Oxide</i> NO)
Mukarami .A. dkk ⁽²¹⁾ (Am Soc for Nutr. 2005)	2005	Eksperimental	Kultur sel: RAW264.7 cells ,mouse <i>macrophage</i>	1'- Acetoxychavicol acetate dari <i>Alpinia galanga</i> , <i>Zingiberaceae</i> dan zerumbone (<i>zingiber</i> , <i>zerumbet</i> , <i>Zingiberaceae</i>) berfungsi sebagai antikanker melalui efek sebagai anti inflamasi dengan menghambat <i>cyclooxygenase-2</i> (COX)-2 mRNA pada <i>mouse macrophage</i>
Zaeoung.S. dkk ⁽²³⁾ (J.Sci.Tecnol, 2005,	2004	Eksperimental	<i>Cell lines</i> : MCF7 (breast adeno-carcinoma) dan LS174T	Efek alpinia galanga sebagai antioksidan, menghilangkan radikal bebas dan mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap

27(4):799-812)			(colon adeno-carcinoma)	tumor pada <i>cell lines</i> .
Tachakitti-rungrod.S. dkk ⁽²⁴⁾ (Depart pharm sciences, facul of pharmacy)	2007	Eksperi-mental	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin e-6-sulfonic acid) (ABTS)	Minyak esensial dari <i>Hyptis suaveolens (Labiatae)</i> dan <i>Alpinia galangal</i> mempunyai efek antioksidan dan aktivitas antimikroba
Moffat.J. dkk ⁽²⁵⁾ (Carcinogenesis 2000; 21(12): 2151-57)	2000	Eksperi-mental	Kultur sel dari <i>Ehrlich acites tumor cells</i> , 1x10 ⁶ cells/ml dalam <i>fresh medium</i>	ACA menginduksi apoptosis, melalui metabolisme polyamin dan aktivasi caspase-3 pada tumor sel Ehrlich ascites.
Ito.K. dkk ⁽²⁵⁾ (Cancer res 2005 may 15; 65)	2005	Eksperi-mental	Kultur sel, dari Human multiple myeloma <i>cell line</i> termasuk RPM18226,U266 dan IM-9	Menghambat pertumbuhan sel myeloma pada manusia dengan menghambat NF-κB dan mengurangi massa tumor.

Penelitian berbeda dengan penelitian terdahulu, penelitian ini dengan metode eksperimental, menggunakan mencit C3H 28 ekor dibagi dalam 4 kelompok, kelompok Kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak *Alpinia galanga* dosis bertingkat (225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari, 750 mg/kgBB/hari). Aktivitas proliferasi dievaluasi menggunakan imunohistokimia Ki-67. Indeks Apoptosis dievaluasi dengan imunohistokimia Tunel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd)

Klasifikasi :

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Liliopsida
Order	: Zingiberales
Subfamily	: Alpinioideae
Tribe	: Alpinieae
Genus	: <i>Alpinia</i>
Species	: <i>A. galanga</i>
Binomial name	: <i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd ⁽¹⁶⁾

Lengkuas mempunyai nama daerah Laos (Jawa) sering digunakan sebagai bumbu penyedap masakan atau rempah, mempunyai aroma harum dan rasa yang pedas. Banyak ditemukan di wilayah Asia Tenggara, di Indonesia, China dan Thailand. Selain untuk penyedap, digunakan juga sebagai obat tradisional, untuk mengobati gangguan lambung, menghilangkan kembung, anti jamur, menghilangkan gatal, menambah nafsu makan, demam dan sakit tenggorokan. Akhir-akhir ini banyak digunakan sebagai pengobatan dan pencegahan (*Chemoprevention*) kanker.^{17,18,19,21}

Lengkuas ada 2 macam lengkuas merah dan lengkuas putih. Lengkuas putih banyak dipakai sebagai bumbu penyedap dan lengkuas merah lebih mempunyai khasiat sebagai obat. Dari penelitian Rusmarilin, kandungan ACA (*1' acetoxyl chavicol acetate*) lebih banyak pada ekstraksi lengkuas merah daripada lengkuas putih.^(17,18) Dari penelitian sebelumnya membuktikan bahwa kandungan ACA pada lengkuas mempunyai potensi untuk menurunkan angka kejadian kanker yang diinduksi oleh karsinogen.^{17,19,21,23,25}

ACA yang terkandung pada ekstrak Lengkuas mempunyai aktivitas anti kanker dan antioksidan pada alur sel kanker, sel kanker manusia dan mencit yang ditransplantasi dengan sel tumor primer. Penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel yang hidup dalam kultur dengan hemositometer, penghambatan yang terjadi diduga karena apoptosis. Penghambatan ini dipengaruhi jenis, usia dan konsentrasi ekstrak lengkuas. Kandungan ACA yang tertinggi terdapat pada lengkuas merah usia 9 bulan dengan pelarut yang tidak beracun yaitu pelarut *ethyl acetat*. Waktu untuk ekstraksi yang optimal diperoleh selama 48 jam, penyimpanan rimpang lengkuas merah pada lemari pendingin (7-10°C) menunjukkan hasil yang baik dibandingkan penyimpanan pada suhu kamar (28-30°C). Makin lama rimpang lengkuas disimpan kadar ACA-nya akan makin menurun. Penyimpanan rimpang lengkuas merah pada lemari pendingin (7-10°C) sampai 4 minggu, masih mengandung ACA 0,44%, bila 6 minggu menjadi 0.21%. Pada penyimpanan pada suhu kamar (28-30°C) sebaiknya sampai 2

minggu, karena kadar ACA masih cukup tinggi yaitu 0.43%. Pada penyimpanan 4 dan 6 minggu kandungan ACA menurun menjadi 0,05% dan 0,01%. Dosis 50 mg/kgBB paling baik dalam menghambat pertumbuhan kanker karsinoma tubular padat. Pada dosis 750 mg/kg akan memberikan gambar makroskopik dan mikroskopis lebih baik, secara makroskopik dilihat dari rasio berat jaringan kanker terhadap berat badan mencit relatif lebih kecil dibandingkan dengan pemberian dosis rendah dan secara mikroskopis menunjukkan jaringan nekrosis yang luas. Hasil uji toksisitas secara *in vivo* berdasarkan pengukuran LD₅₀ terhadap mencit strain C₃H yaitu sebesar 765 mg/kg BB. Pada konsentrasi 765 mg/kg BB merupakan batas konsentrasi tertinggi karena mematikan 50% mencit percobaan.¹⁷

Aquous acetone pada ekstrak *Alpinia galanga* menunjukkan penghambatan produksi *Nitric oxide* (NO) pada LPS (*lipopolysaccharide*) makrofag peritoneal mencit yang teraktivasi.¹⁹ Penelitian mengenai ACA pada lengkuas dikombinasi dengan *auraptene*, *nobiletin* dan *zerumbone* serta meneliti mekanisme molekuler yang mendasari, terhadap penghambatan *cyclooxygenase(COX)-2 mRNA expression* pada LPS makrofag mencit yang teraktivasi, didapatkan efek supresi ACA terhadap COX-2. Disimpulkan bahwa *phytochemical* dapat sebagai kemopreventif dengan penghambatan inflamasi yang berhubungan dengan penghambatan karsinogenesis dan dengan kombinasi beberapa *phytochemical* akan memberikan hasil yang baik, karena masing-masing *phytochemical* mempunyai cara kerja yang berbeda.²¹

Ekstrak metanol, air dan *volatil oil* dari *Alpinia galanga* digabung dengan *Boesenbergia pandurata*, *Curcuma longa*, *Kaemferia galanga* dan *Zingiber afficinale* mempunyai efek menghilangkan radikal bebas, pada penelitian menggunakan *cell line 1,1-diphenil-2-picrylhydrazil (DPPH)*. Disamping itu juga mempunyai aktivitas sitotoksik pada penelitian menggunakan *MCF 7 (breast carcinoma)* dan *LST174T (colon adenocarcinoma) cell lines*.²³

Minyak esensial dari *Hyptis suaveolens (Labiatae)* dan *Alpinia* yang di hidrodistilasi bersama, akan mempunyai aktivitas antioksidan dan anti-mikroba. Disebabkan karena mengandung *1,8-cieole,4-allyphenyl acetate and β -bisabolene* dengan minyak esensial. Kemampuan antimikroaba pada kuman *staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiac*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esheria coli*, *Pasteurella multicocida* dan *Actinomyces pyogenes*.²⁴

Pada penelitian untuk mengetahui ACA dalam menginduksi apoptosis, diteliti melalui efek metabolisme *polyamine* dan aktivasi *caspase-3* pada tumor sel *Ehrlich ascites*. Pada penelitian ini ACA menghambat *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* sehingga akan menurunkan *ornithine decarboxylase (ODC)* dan meningkatkan *Spermidine/spermin N'acetyl-transferase (SSAT)* sehingga menyebabkan gangguan jalur metabolisme *polyamine*. Bila *Polyamine* intraseluler menurun atau terjadi gangguan jalur metabolisme *polyamine* akan memacu aktivitas *caspase-3* yang akan mengakibatkan apoptosis. Pada penelitian ini didapatkan ACA tidak

mempunyai efek sitotoksik pada hepatosit tikus normal.²⁵ Pada penelitian untuk mengetahui efek ACA pada pertumbuhan sel myeloma pada manusia, didapatkan efek penghambatan ACA terhadap NF- κ B dan pengurangan massa tumor.²⁶

2.2 Proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi dalam regulasi sel.

Jumlah sel pada suatu jaringan merupakan fungsi kumulatif, antara masuknya sel baru dan keluarnya sel yang ada pada populasi. Masuknya sel baru ke dalam populasi jaringan ditentukan oleh kecepatan proliferasinya. Sel dapat meninggalkan populasinya karena kematian sel (apoptosis) ataupun karena berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Peningkatan jumlah sel dalam populasi tertentu dapat terjadi karena peningkatan proliferasi, penurunan apoptosis atau diferensiasi sel.

Apoptosis adalah proses fisiologis untuk menjaga keseimbangan populasi sel atau homeostasis. Diferensiasi sel pada fase G0 (*resting/istirahat*) memungkinkan berproliferasi bila diperlukan, bila terjadi stimulasi akan terjadi proliferasi dengan memasuki siklus G1.

Proliferasi sel distimulasi oleh faktor pertumbuhan intrinsik, jejas, kematian dan kerusakan sel, mediator biokimiawi dari lingkungan. Kelebihan stimulus atau kekurangan inhibitor akan menyebabkan pertumbuhan sel yang tak terkontrol atau terjadinya kanker. Penginduksian pertumbuhan sel dihubungkan dengan pemendekan siklus sel pada fase G0 sampai sel memasuki siklus sel. Pada fase G0 sampai memasuki siklus sel terdapat penghambatan fisiologis untuk terjadinya proliferasi sel.

Pertumbuhan sel dapat dicapai dengan memperpendek atau memperpanjang siklus sel.^{5,27,28}

2.3 Siklus sel

Pada mamalia, proliferasi sel diawali adanya stimulus eksternal seperti *growth factor* untuk memasuki G1, satu sel akan mengalami replikasi sampai akhir G1 kemudian *growth factor* akan menetap menjadi *growth factor induced signal* atau menjadi *growth factor inhibitor* seperti *TGFβ* perubahan tersebut tergantung dari protein yang mengatur siklus sel. *Mitogen* dan *growth factor* menginduksi sel untuk memasuki siklus sel melalui kontrol point *G1 restriction point*.

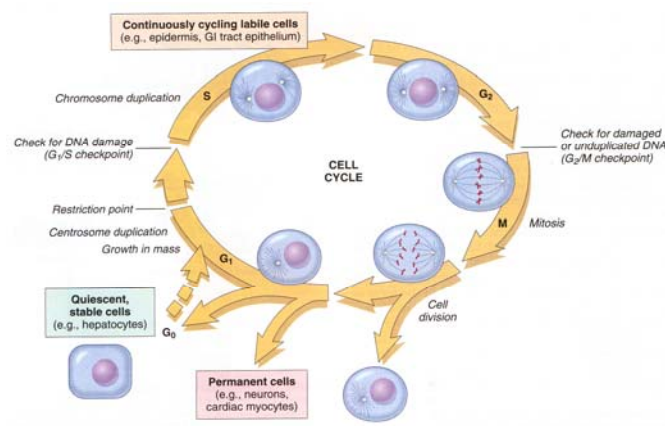
Proses pembelahan sel menjadi pembelahan selanjutnya melalui tahapan yang disebut siklus sel. Siklus sel terdiri dari 4 tahapan yaitu *presynthetic growth phase I* (G1), *DNA synthetic phase* (S), *premitotic growth phase* (G2) dan *mitotic phase* (M). *Quiescent cells* atau fase istirahat disebut G0. Lamanya siklus sel rata-rata adalah 16 jam (1 jam untuk M dan 15 jam untuk interphase), lamanya siklus sel tergantung tahapan-tahapan dalam siklus sel. Tahapan-tahapan dalam siklus sel antara lain, G1 (*presynthetic*) : sel menyiapkan diri untuk sintesis DNA dan biosintesis RNA dan protein. S (*DNA Synthesis*) : replikasi DNA dan sintesa histone, pada fase akhir DNA mengandung sel ganda dan replikasi kromosom. G2 (*premitotic*) : sel menyiapkan diri untuk membelah, replikasi kompleks DNA dengan protein dan biosintesis, M (*mitotic*) : pembelahan inti dan

sitoplasma menjadi 2 sel, G0: fase istirahat, tidak ada mitogen, sel matur/akhir diferensiasi misal sel neuron.

Keluar dan masuknya sel kedalam siklus sel dikontrol oleh perubahan tingkatan dan aktivitas protein yang disebut *cyclins*. Protein yang berhubungan dengan siklus sel yaitu *cyclins dependent kinase* (CDKs) dan *Cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKIs). *Cyclins* tersebut sangat penting untuk signal transduksi dan koordinasi pada tiap tahapan siklus sel. Sintesis dan degradasi dari CDKs diatur oleh ikatan CDK *inhibitors*. Penting untuk pengaturan *Cells cycle checkpoints* (G1→S dan G2→M) menahan siklus sel bila terjadi kerusakan DNA supaya tidak terjadi replikasi.

Checkpoint yang berfungsi untuk merespon sel terhadap kerusakan DNA, proses ini sangat penting untuk menjaga integritas sel/genome. Pada siklus sel terdapat beberapa *checkpoint* yaitu : G1 *checkpoint* untuk pada fase S, G2 *checkpoint* menahan siklus sel, sebagai respon kerusakan DNA yang tidak replikasi selama fase S, M *check point* untuk menginaktifkan *chromosomal segregation* sebagai respon dari *misalignment* pada *mitotic spindle*.

Komponen dari checkpoint adalah protein yang beraksi sebagai sensor kerusakan DNA, *signal transducer* atau *effector*. Gangguan dari fungsi *checkpoint* akan mengakibatkan mutasi yang dapat menginduksi karsinogenesis.^{5,6,7,27,28}



Gambar 2.1 Siklus sel

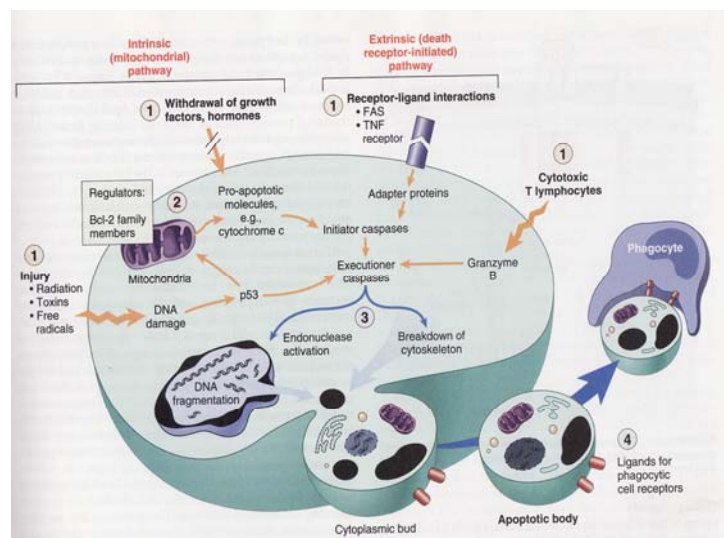
(Sumber: Pathologic Basis of Disease 7th ed, 2005. Kumar, Abbas, Fausto)

2.4 Apoptosis

Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Jalur apoptosis diinduksi oleh regulasi program intraselular, dimana sel mati akan mengaktifasi enzim untuk mendegradasi DNA pada nukleus dan protein sitoplasma pada sel itu sendiri. Membran plasma masih utuh, tetapi terjadi perubahan struktur menjadi sel apoptosis yang akan menjadi target phagositosis oleh makrofag. Sel yang mati segera dibersihkan sebelum terjadi kebocoran sel yang akan menyebabkan reaksi inflamasi. Kematian sel dengan jalur apoptosis berbeda dengan nekrosis, pada apoptosis tidak terjadi reaksi inflamasi. Apoptosis penting untuk mengatur kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan membersihkan sel yang rusak yang mempunyai peran penting untuk supresi tumor. Akhir-akhir ini, apoptosis digunakan untuk target terapi kanker. Sel yang apoptosis akan menunjukkan sel melisut (*cell shrinkage*), pepadatan kromatin (*chromatin condensation*) kemudian menjadi sel apoptosis atau

badan apoptosis yang akan memudahkan untuk difagositosis oleh makrofag. Mekanisme utama dalam apoptosis diperankan oleh kinase di *growth factor signaling pathways* dan *particular proteases* yang disebut caspase.^{5,27,28}

Proses apoptosis dibagi menjadi *initiation phase* selama caspase menjadi aktif mengkatalisis dan *excution phase* yaitu selama enzim bereaksi menjadikan sel apoptosis. Mekanisme apoptosis dibagi menjadi dua yaitu mekanisme ekstrinsik (*death receptor – initiated pathways*) dan mekanisme intrinsik (*mitochondrial pathways*).



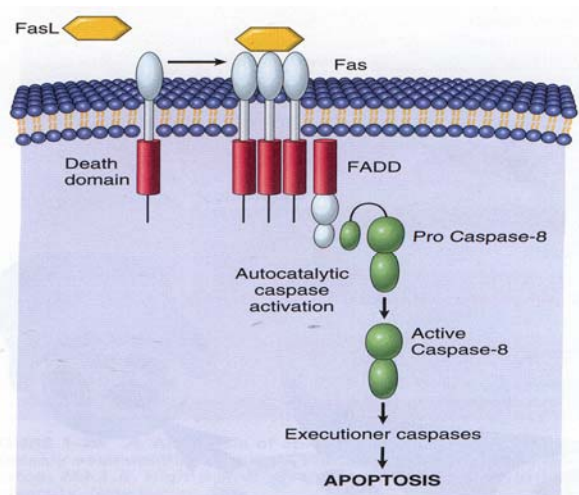
Gambar 2.2 Jalur apoptosis

(Sumber: Pathologic Basis of Disease 7th ed, 2005. Kumar, Abbas, Fausto)

Mekanisme ekstrinsik diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota dari *tumor necrosis factor receptor family*(TNF) mempunyai *cytoplasmic domain* yang berisi protein interaksi disebut *death domain*, penting untuk mengirim *apoptotic signals*.

Beberapa TNF receptor family tidak mempunyai *cytoplasmic death domain*, mekanisme apoptosisnya sedikit diketahui. *Death receptor* antara lain adalah Type I TNF receptor (TNFR I) dan protein yang berhubungan disebut Fas (CD95). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh death receptor diilustrasikan dengan baik oleh Fas.

Diawali *Fas ligand* (FasL) melepaskan *Fas* dari ligandnya. Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat death domain, tempat untuk berikatan dengan adapter protein yang juga mempunyai death domain dan disebut FADD (*fas-associated death domain*). FADD yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan inaktif dari *caspase-8* (di manusia, *caspase 10*) melalui *death domain*. Multiple pro caspase-8 molekul kemudian dibawa ke dekatnya dan mereka saling berikatan untuk mengaktifkan *caspase-8*, yang kemudian enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan meng-aktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan *execution phase* dari apoptosis. Mekanisme apoptosis dapat dihambat oleh protein yang disebut FLIP, yang berikatan dengan *procaspase-8* tetapi tidak dapat berikatan dan mengaktifkan enzim karena kurang mempunyai aktifitas enzim. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan digunakan untuk menghambat dan memproteksi infeksi dan memproteksi sel normal dari *Fas mediated-apoptosis*.

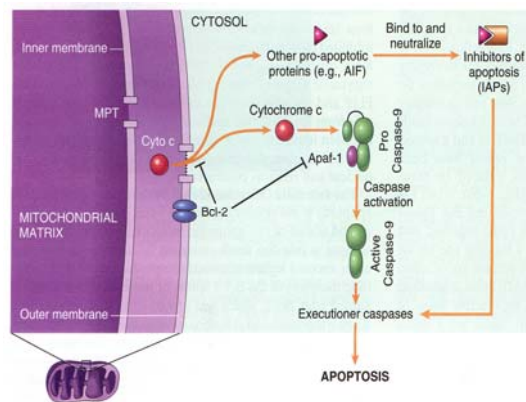


Gambar 2.3 Jalur ekstrinsik apoptosis

(Sumber: Pathologic Basis of Disease 7th ed, 2005. Kumar, Abbas, Fausto)

Mekanisme intrinsik diawali dari mitokondria yang disebabkan stimulus internal seperti kerusakan DNA dan stress oksidatif. Jalur intrinsik disebabkan oleh peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma. Growth factor dan *survival signal* menstimulasi produksi *anti-apoptotic members* dari Bcl-2 *family*. Bcl-2 *family* mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi regulasi apoptosis. Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti-apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membrane mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan kelompok protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membrane mitokondria menyebabkan

keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade*. Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) dan mengaktifkan *caspase-9*. (Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1). Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade*.^{5,27,28}



Gambar 2.4 Jalur intrinsik apoptosis

(Sumber: Pathologic Basis of Disease 7th ed, 2005. Kumar, Abbas, Fausto)

Fase eksekusi (*the execution phase*), akhir dari fase apoptosis yang dibantu *proteolytic cascade*. *Caspase family* terdiri lebih dari 10 macam yang mempunyai 2 fungsi dasar yaitu *initiator caspase* seperti *caspase-8*, *caspase-9* dan *executioner caspase* seperti *caspase-3* dan *caspase-6*. *Executioner caspase* bekerja pada komponen sel. Berikatan dengan

cytoskeletal dan *nuclear matrix proteins* yang menyebabkan gangguan pada *cytoskeleton* dan *breakdown* pada nukleus. Target aktivasi caspase di nukleus antara lain transkripsi, DNA replikasi dan DNA repair.

Menghilangkan sel apoptosis (*Removal of Dead Cells*), sel apoptosis mempunyai marker molekul pada permukaan, yang membuat dikenali sel didekatnya untuk difagosit dan dihilangkan. Makrofag reseptor akan berikatan dengan sel apoptosis yang menyebabkan sel apoptosis dapat difagositosis. Proses fagositosis sangat efisien menghilangkan sel yang mati sehingga tidak menyebabkan proses inflamasi.

2.5 Onkogen dari sel tumor

Penelitian mengenai onkogenik pada manusia menggunakan *DNA transfection assay*, untuk mengidentifikasi sel tumor yang mempunyai proliferasi tidak terkontrol. DNA yang telah diekstraksi dari sel tumor manusia dan dipotong-potong menjadi beberapa fragmen, kemudian dipindahkan ke mencit melalui *cell line* (NIH-3T3), selanjutnya digabungkan dengan *genome*, akan menghasilkan sel yang mengalami transformasi karena kehilangan kontak untuk inhibisi. Sel yang mengalami transformasi dapat menghasilkan sel tumor ketika di injeksikan melalui atymic mencit. Genome yang dari sel yang mengalami transformasi mengandung onkogen. Terjadinya tumor disebabkan adanya *chromosome translocation*. Translokasi kromosom tersebut diidentifikasi sebagai onkogen.^{5,27,28}

2.6 Mekanisme Inflamasi menyebabkan karsinogenesis

Inflamasi mendasari patofisiologi dari beberapa penyakit, termasuk perkembangan neoplasma. Aktivasi sel-sel inflamasi pada stromal menginduksi sel tumor untuk tumbuh dan berkembang menjadi tumor ganas. Stimulasi akan menghasilkan biokemikal mediator, termasuk *reactive oxygen*, *nitrogen species* dan *proinflammatory chemokines* dan *cytokines*, *Cyclooxygenase* (COX, PGH₂ sintetase) yang mendonasi 2 molekul oksigen saat metabolisme asam arachidonat menjadi Prostaglandin (PGH₂) melalui peroksidasi, bersama radikal bebas akan menyebabkan aktivasi *peroxidative* dari COX2 yang akan meningkatkan *oxidize aromatic* dan *heterocyclic amines* dan *dyhidrodiol derivat* yang akan meningkatkan progresi pada kanker payudara dan meningkatkan *growth factor*. Radikal bebas, nitric oxide/reactive nitrogen dan oxygen species, akan menyebabkan inflamasi yang akan menyebabkan kerusakan dari protein (*DNA repair enzyme*, *caspase*) yang akan menyebabkan *DNA damage* dan mutasi.^{5,27,28,29,30,31}

Karsinogenesis terbagi dari tiga tahapan yaitu inisiasi, progresi, dan promosi. Inisiasi yaitu sel normal menjadi sel yang terinisiasi/*initiated* atau berubah/*transformed*. Promosi yaitu perubahan sel terinisiasi menjadi sel preneoplasma. Progresi yaitu perubahan sel preneoplasma menjadi sel neoplasma. Dimana inflamasi berperan dalam 3 tahapan karsinogenesis tersebut.^{29,30,31}

2.7 Klasifikasi

Pembagian jenis histologik kanker payudara menurut World Health Organization (WHO) tahun 2003 sebagai berikut³²:

Epithelial tumours

Invasive ductal carcinoma, not otherwise specified

- Mixed type carcinoma

- Pleomorphic carcinoma

- Carcinoma with osteoclastic giant cells

- Carcinoma with melanotic features

Invasive lobular carcinoma

Tubular carcinoma

Invasive cribriform carcinoma

Medullary carcinoma

Mucinous carcinoma and other tumours with abundant mucin

- Mucinous carcinoma

- Cystadenocarcinoma and columnar cell mucinous carcinoma

- Signet ring cell carcinoma

Neuroendocrine tumours

- Solid neuroendocrine carcinoma

- Atypical carcinoid tumour

- Small cell/oat cell carcinoma

- Large cell neuroendocrine carcinoma

Invasive papillary carcinoma

Invasive micropapillary carcinoma

Apocrine carcinoma

Metaplastic carcinomas

Pure epithelial metaplastic carcinomas

Squamous cell carcinoma

Adenocarcinoma with spindle cell metaplasia

Adenosquamous carcinoma

Mucoepidermoid carcinoma

Mixed epithelial/mesenchymal metaplastic carcinomas

2.8 Etiologi dan Patogenesis

Faktor resiko penting untuk perkembangan kanker payudara adalah hormonal dan genetik (*family history*). Kanker payudara dibagi menjadi kasus sporadik yang dihubungkan dengan pengaruh hormonal dan herediter yang dihubungkan dengan genetik atau terjadinya mutasi. Faktor lain yang mempengaruhi terjadinya kanker payudara yaitu faktor lingkungan.

Herediter. Adanya riwayat kanker payudara pada keluarga menjadi peringkat penyebab pertama, didapatkan pada 13% wanita dengan kanker payudara. Hanya 1% yang disebabkan jalur mutasi genetik. Sekitar 25% familial kanker (sekitar 3% dari seluruh kanker payudara) disebabkan penekanan *autosomal-dominant genes*: BRCA1 dan BRCA2. Mutasi yang mempengaruhi protoonkogen dan gen penekan tumor di epitel payudara ikut serta dalam proses transformasi onkogenik. Di antara berbagai mutasi

tersebut, yang paling banyak dipelajari adalah ekspresi berlebihan protoonkogen *ERBB2* (*HER2/NEU*), yang diketahui mengalami amplifikasi pada hampir 30% kanker payudara. Gen ini adalah anggota dari famili reseptor faktor pertumbuhan epidermis, dan ekspresi berlebihannya berkaitan dengan prognosis yang buruk. Secara analog, amplifikasi gen *RAS* dan *MYC* juga dilaporkan terjadi pada sebagian kanker payudara manusia. Mutasi gen penekan tumor *RBI* dan *TP53* juga ditemukan. Dalam transformasi berangkai sel epitel normal menjadi sel kanker, kemungkinan besar terjadi banyak mutasi didapat.

Sporadik. Disebabkan karena paparan hormon, dihubungkan dengan usia menarke dan menopause, riwayat reproduksi, riwayat menyusui, estrogen eksogen. Banyak terjadi pada postmenopause dan overekspresi ER (Estrogen Reseptor). Estrogen merangsang pembentukan faktor pertumbuhan oleh sel epitel payudara normal dan oleh sel kanker. Dihipotesiskan bahwa reseptor estrogen dan progesteron yang secara normal terdapat di epitel payudara, mungkin berinteraksi dengan promotor pertumbuhan, seperti *transforming growth factor α* (berkaitan dengan faktor pertumbuhan epitel), *platelet-derived growth-factor*, dan faktor pertumbuhan fibroblast yang dikeluarkan oleh sel kanker payudara, untuk menciptakan suatu mekanisme autokrin perkembangan tumor.

Faktor lingkungan. Pengaruh lingkungan diisyaratkan oleh insiden kanker payudara yang berbeda-beda dalam kelompok yang secara genetis homogen

dan perbedaan geografik dalam prevalensi. Faktor lingkungan lain yang penting adalah iradiasi dan estrogen eksogen.^{1,5}

2.9 Ki67

Ki67 digunakan untuk mendeteksi/mengevaluasi faktor pertumbuhan dari jaringan neoplasma/proliferasi sel.³³ Ki-67 protein dikenal sebagai monoclonal antibody Ki-67 atau MK167.³⁴

Ki67 adalah *nonhistone nuclear protein* yang berhubungan dengan siklus sel, yang diekspresikan pada sel yang berproliferasi selama pertengahan fase G1, meningkat pada saat memasuki fase S dan G2, dan mencapai puncak pada fase M pada silus sel, dan dikatabolisme dengan cepat pada akhir fase M dan tidak terdeteksi pada fase G0 dan awal G1. Ekspresi Ki67 sangat berhubungan dengan pertumbuhan (*growth fraction*) dan tidak nampak selama proses perbaikan DNA. Ki67 dihubungkan dengan petanda proliferasi sel, dan pada *invasive breast cancer* digunakan untuk menentukan grading yang berhubungan dengan prognosa pasien.^{35,36,37,39,40,41}

Pada interfase Ki-67 antigen dapat dideteksi melalui nukleus, pada saat terjadinya mitosis banyak protein dilokasikan dipermukaan kromosom.

Ki-67 adalah monoklonal antibodi yang dihasilkan dengan mengimunisasi mencit dengan nuklei hodgkin lymphoma cell line L 428. Penamaan berasal dari nama kota asal yaitu Kiel dan penomoran dari *original clone* pada 96-well plate. MIB-1 yang digunakan adalah monoclonal antibody yang mendeteksi Ki-67 antigen. Ki-67 labeling index digunakan setelah jaringan

diprosesing dengan formalin, parafin dan embedding dan setelah dipanaskan dengan perantara antigen retrieval.³⁴

2.10 Tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) assay

Sel apoptosis mempunyai bentuk kondensasi kromatin menjadi kasar, *shrinkage*/penyusutan sel dan nukleus, fragmentasi nukleus dan protuberan (pembengkakan) pada permukaan sel yang menghasilkan badan apoptosis, yang dikelilingi oleh halo yang jernih, yang dapat dilihat secara mikroskopis, dengan prosesing jaringan rutin, pengecatan rutin H&E maupun pengecatan imunohistokimia TUNEL.^{7,8,12,13} Prinsip metoda ini adalah perpaduan antara reaksi molekular dengan imunohistokimia, dimana reaksi molekular ditandai adanya ligasi antar fragmentasi DNA dengan deoxigenin dengan bantuan enzim TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) dan reaksi imunohisto-kimia yang ditandai adanya reaksi imunologi yaitu reaksi antara antigen dan antibodi dan reaksi kimiawi yaitu adanya reaksi enzim dengan substrat.^(5,27,28) Pemeriksaan Tunel menggunakan TdT-FragEL detection kit, pada pemeriksaan ini, ikatan TdT untuk menampakkan akhir 3-OH dari fragmentasi DNA, penambahan katalisa dari *biotin-labeled* dan *unlabeled deoxy-nucleotides* pada bagian ini. Biotinylated nucleotides akan dideteksi menggunakan ikatan streptavidin-horseradish peroxidase. Reaksi di amino-benzidine dengan sampel yang dilabel akan menyebabkan warna pada DNA fragmentation.⁴²

2.11 Target molekular terapi herbal untuk prevensi dan terapi kanker

Target dan mekanisme molekular herbal untuk prevensi dan terapi kanker sedikit diketahui. Tumorigenesis adalah berbagai tingkatan yang mengaktifkan karsinogen lingkungan, faktor inflamasi dan tumor promotor. Karsinogen akan memodulasi transkripsi faktor (NF- κ B, AP-1, STAT3), anti apoptosis protein (Akt, Bcl-2, Bcl-XL), pro-apoptosis protein (caspase, PARP), protein kinase (IKK, EFGR, HER2, JNK, MAPK), protein siklus sel (*cyclin*, *cyclin dependent kinase*), *cell adhesion molecules*, COX-2 dan *Growth factor signaling pathways*.

Nuklear factor-kappa B (NF- κ B) adalah berhubungan dengan protein dimmers yang berikatan dengan DNA disebut κ B site. NF- κ B berhubungan dengan kanker, diaktivasi oleh radikal bebas, stimulus inflamasi, cytokines, karsinogen, tumor promotor, endotoksin, rasiasi, ultraviolet dan X-rays. Bila terjadi aktivasi maka akan terjadi translokasi di nukleus, yang akan menginduksi ekspresi lebih dari 20 gen yang akan menekan apoptosis dan menginduksi transformasi sel, proliferasi, inflamasi, metastasis, kemoresisten, rasioresisten dan inflamasi. Dimana gen tersebut akan menunjukkan terjadinya kanker termasuk ekspresi cyclin D1, menekan apoptosis protein Bcl-2 dan Bcl XL dan terjadi angiogenesis dan metastasis.

Siklus sel, diatur oleh cyclin dan cyclin dependent kinase, cyclin D1, Cdk-4 dan Cdk-6. Gangguan dari pengaturan waktu, *check point*, dan over ekspresi dari *growth promoting cell cycle factor* seperti cyclin D1 dan CDK akan

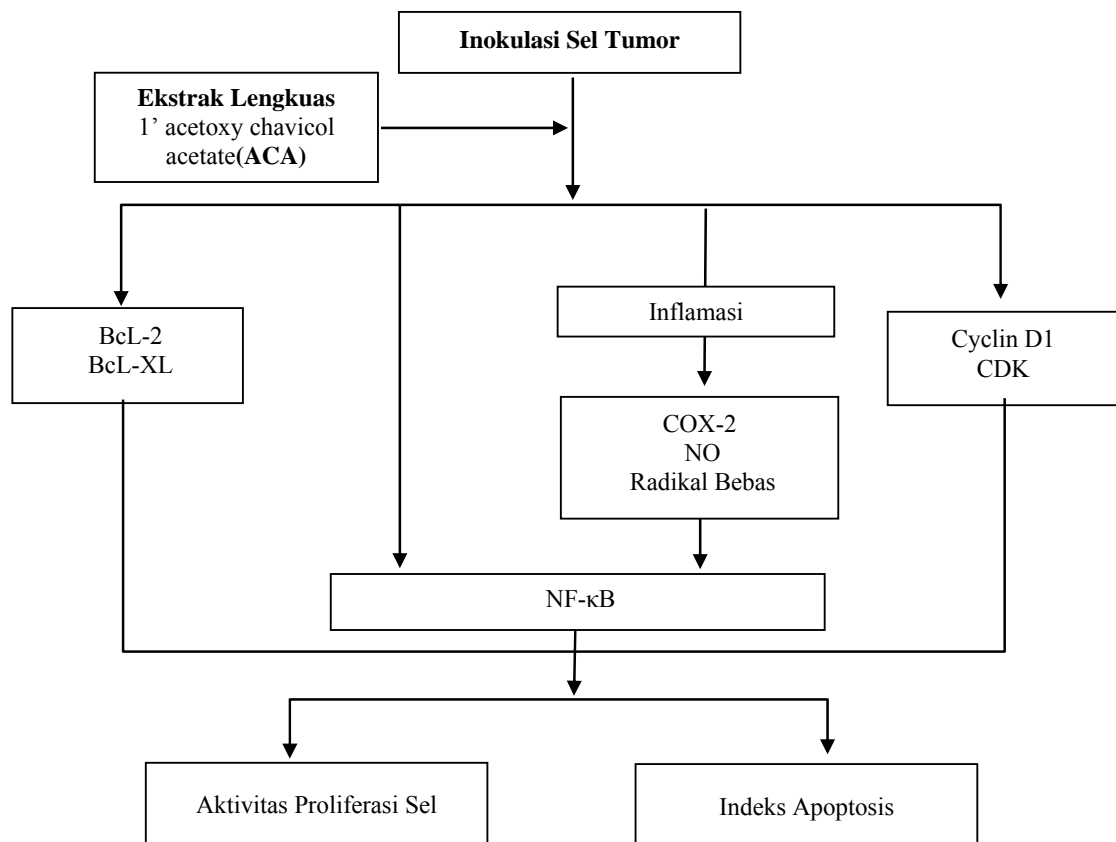
menyebabkan tumorigenesis. Beberapa *phytochemicals* menunjukkan menghambat gangguan pada pengaturan siklus sel pada kanker.

Apoptosis, menunjukkan menjadi keseimbangan secara alami antara sel mati dan sel matur dengan menghancurkan sel yang rusak dan abnormal. Ekspresi NF- κ B, Bcl-2, Bcl-XL, cIAP, survivin, TRAF1 dan TRAF2 menyebabkan menghambat jalur apoptosis. Beberapa phytochemical menunjukkan menghambat aktivasi NF- κ B atau AP-1 yang akan menekan proliferasi dan menginduksi apoptosis.⁴³

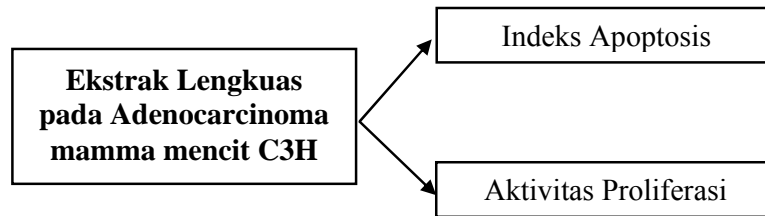
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis mayor

Pemberian ekstrak *Alpinia galanga* dosis bertingkat pada mencit C3H akan menurunkan aktivitas proliferasi dan meningkatkan indeks apoptosis sel adenokarsinoma mamma.

3.3.2 Hipotesis minor

Terjadi penurunan skor aktivitas proliferasi dan peningkatan skor indeks apoptosis pada sel adenokarcinoma mamma mencit C3H antar kelompok yang diberi ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis bertingkat 225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari dibanding kelompok Kontrol.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu patologi anatomi, biologi molekuler dan farmakologi.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama lebih kurang 8 minggu.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium, menggunakan desain *post test controled group* dengan hewan coba mencit betina strain C3H.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

4.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian meliputi mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.

4.4.2 Sampel Penelitian

4.4.2.1 Besar Sampel

Besar sampel berdasarkan kriteria WHO, setiap kelompok terdiri atas minimal 7 ekor mencit.⁴⁴ Besar sampel keseluruhan adalah 28 ekor mencit.

4.4.2.2 Cara Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diperoleh dari populasi secara *simple random sampling*, dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi
 - a. Mencit betina
 - b. Strain C3H
 - c. Umur 3 – 4 bulan
 - d. Berat badan 20 – 30 gram
 - e. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal.
2. Kriteria eksklusi
 - a. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi.
 - b. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif)
 - c. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*).

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* (lengkuas) dengan dosis bertingkat 225 mg/kgBB, 450 mg/kg dan 750 mg/kgBB.

4.5.2 Variabel Tergantung

1. Aktivitas proliferasi yaitu proses pembelahan sel, melalui tahapan yang disebut siklus sel. Pembelahan sel terdiri dari 4 tahapan yaitu G1, S, G2 dan M, yang akan memberikan ekspresi positif dengan pewarnaan immuno-histokimia Ki67 pada semua tahapan kecuali tahapan G0, skala rasio.
2. Indeks apoptosis yaitu persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dari 10 lapangan pandang dengan pembesaran 400X. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak, yang akan memberikan ekspresi positif dengan pewarnaan immunohistokimia Tunel, skala rasio.

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bahan uji rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) diperoleh dan diekstraksi di bagian Laboratorium Pengujian Nutrisi Bahan baku Obat UNDIP di Institusi Obat Alam Indonesia. Lengkuas merah segar dengan umur panen 9 bulan, diperlukan kurang lebih 0,713 kg Lengkuas merah untuk masa penelitian 20 hari dengan perhitungan 40 ekor mencit C3H. (Lampiran 3)
2. Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 3-4 bulan dan berat 20-30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
3. Sel tumor Adenokarsinoma mamma diperoleh dari mencit donor.
4. Bahan-bahan untuk penatalaksanaan jaringan, pembuatan sediaan histopatologik dan immunohistokimia.
5. *Monoclonal Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen*, DakoCytomation code No. M 7249.
6. BioVision's *Apo-BrdU-IHC Kit, two color TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling)*.

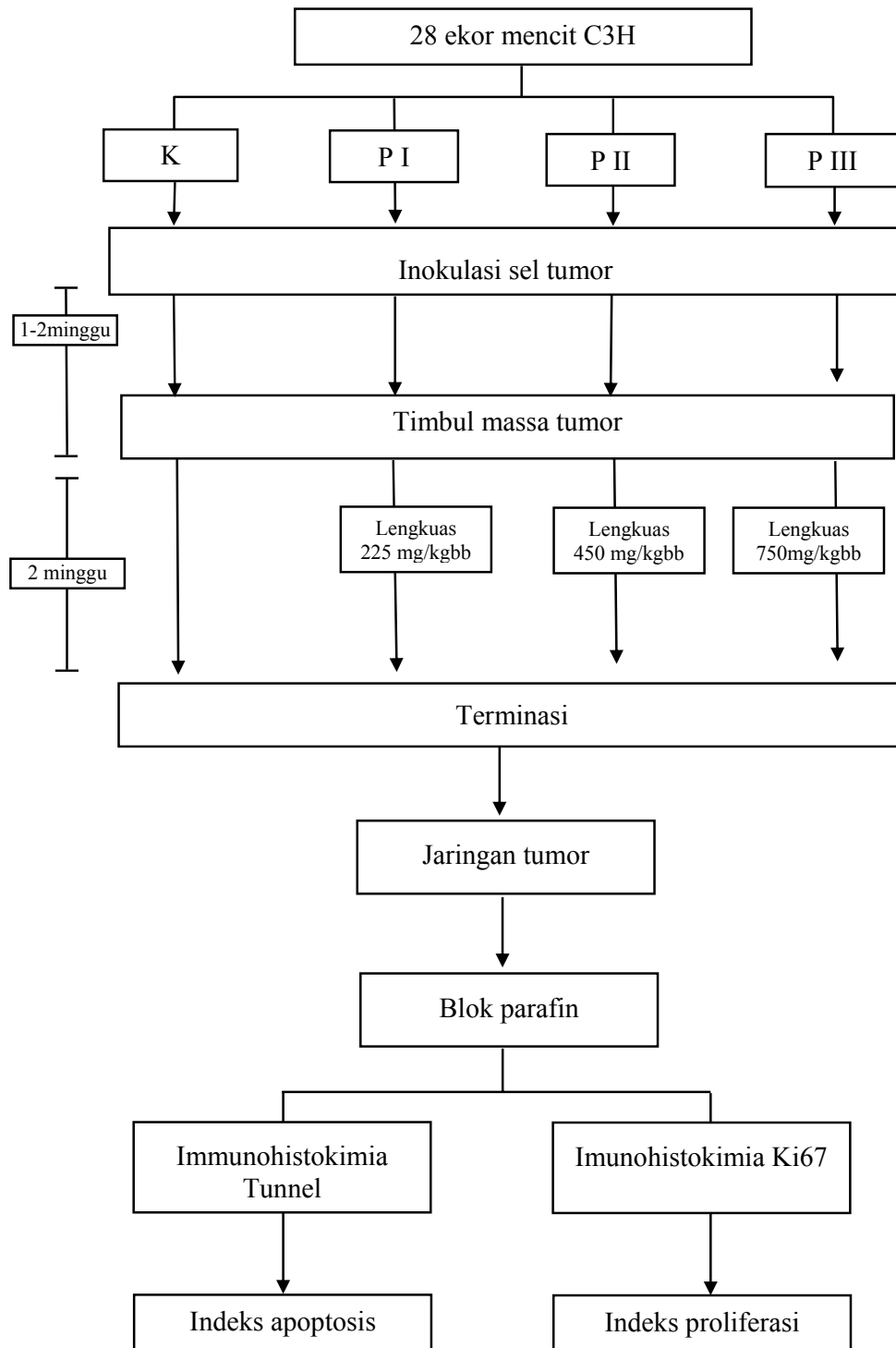
4.6.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Kandang mencit.
2. Spuit khusus untuk memasukkan ekstrak per oral.
3. Seperangkat alat bedah minor.

4. Alat-alat ekstraksi bahan obat sesuai prosedur baku Laboratorium Pengujian Nutrisi Bahan baku Obat UNDIP di Institusi Obat Alam Indonesia.
5. Alat-alat penatalaksanaan jaringan, pembuatan sediaan histopatologik dan imunohistokimia.
6. Mikroskop binokuler.

4.7 Alur Kerja



Gambar Alur Kerja

Keterangan :

- K : Kelompok kontrol I mencit C3H diberi diet standar dan diinokulasi sel tumor, setelah timbul massa tumor (1-2 minggu), tidak mendapatkan *alpinia galanga* setelah 2 minggu dilakukan terminasi.
- P1 : Kelompok perlakuan I, mencit C3H yang diinokulasi sel tumor dan diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), kemudian mendapat *alpinia galanga* 225 mg/kgBB selama 2 minggu.
- P2 : Kelompok perlakuan II, mencit C3H yang diinokulasi sel tumor dan diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), kemudian mendapat *alpinia galanga* 450 mg/kgBB selama 2 minggu.
- P3 : Kelompok perlakuan III, mencit C3H yang diinokulasi sel tumor dan diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), kemudian mendapat *alpinia galanga* 750 mg/kgBB selama 2 minggu.

4.8 Cara kerja

Dua puluh ekor mencit betina strain C3H dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok terdiri dari 7 mencit C₃H, kemudian dikandangkan sesuai kelompok dan pada tiap mencit diberi penomoran dengan memberi tanda pada telinga tiap mencit. Semua mencit dari K, P1, P2 dan P3 dilakukan inokulasi sel tumor mamma (Lampiran 4). Kemudian diberi perlakuan sebagai berikut:

K diberi diet standar, setelah timbul massa tumor (1-2 minggu), tidak mendapatkan perlakuan (ekstrak Lengkuas). P1 diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), mendapat ekstrak lengkuas merah 225

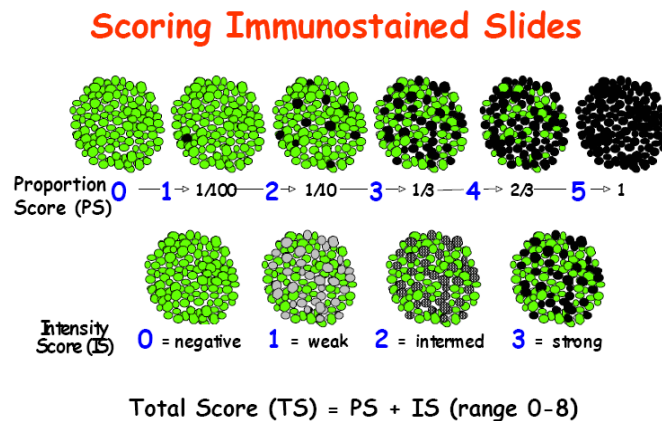
mg/kgBB selama 2 minggu. P2 diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), mendapat ekstrak lengkuas merah 450 mg/kgBB selama 2 minggu. P3 diberi diet standar, setelah timbul benjolan (1-2 minggu), mendapat ekstrak lengkuas merah 750 mg/kgBB selama 2 minggu.

Tiap kelompok setelah timbul massa tumor, diukur volume tumornya dengan kaliper, selanjutnya pengukuran dilakukan 1 minggu sekali. Berat badan mencit ditimbang saat mulai penelitian, dilanjutkan penimbangan setiap 1 minggu sekali. Setelah masa perlakuan berakhir, mencit diterminasi. Cara terminasi memperhatikan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975 dan Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK), mencit dianestesi dengan ether menurut kelompoknya, selanjutnya mencit diterminasi dengan cara di dislokasi servikalnya. Kemudian diambil jaringan tumor dilakukan pengukuran volume tumor. Jaringan tumor diproses menjadi blok parafin (Lampiran 3), kemudian dibuat preparat untuk pemeriksaan histopatologik dengan pewarnaan jaringan dengan HE (Lampiran 4). Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohisto-kimia Ki67 (Lampiran 5) dan Tunel (Lampiran 6).

4.9 Definisi Operasional

1. Aktivitas proliferasi adalah proses pembelahan sel, melalui tahapan yang disebut siklus sel. Siklus sel terdiri dari 4 tahapan yaitu G1, S, G2 dan M. Aktivitas proliferasi dapat dinilai menggunakan Ki67 yaitu *nonhistone nuclear protein*, yang akan mengekspresikan seluruh tahapan siklus sel kecuali fase istirahat (G0). Aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah sel yang mengekspresikan antibodi

monoklonal Ki67 ditandai dengan inti sel yang berwarna coklat. Tiap slide dinilai 10 lapangan pandang dengan pembesaran 400X. Dilakukan penilaian jumlah/persentase sel yang terekspresi positif dan intensitas warnanya, dengan menggunakan skoring Allred.^{7,48,49,50}



Gambar 4.1 *ALLRED SCORING*

2. Indeks apoptosis dihitung dengan melihat jumlah sel apoptosis. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Sel apoptosis mempunyai tanda-tanda kondensasi dan fragmentasi inti dan dikelilingi oleh halo, dapat dilabel dengan Tunel, yang akan mengekspresikan warna coklat pada inti sel.

Jumlah sel apoptosis yang terekspresi positif dilakukan penghitungan :

- Indeks apoptosis,yaitu dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dari 10 lapangan pandang dengan pembesaran 400X, kemudian dinilai index apoptosis dengan rumus:

$$\text{Index apoptosis (IA)} = (\text{sel apoptosis/total sel}) \times 100\%.$$
^{7,48,49,50}

4.10 Analisis Data

Data yang telah diperoleh meliputi skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis dari empat kelompok, yaitu kelompok kontrol (K) kelompok P1 yang mendapatkan ekstrak *Alpinia galanga* 225 mg/kgBB/hari, P2 yang mendapatkan ekstrak *Alpinia galanga* 450 mg/kgBB/hari dan P3 yang mendapatkan ekstrak *Alpinia galanga* 750mg/kgBB/hari. Karena mencit percobaan kelompok P1 mati 1 ekor, P2 mati 5 ekor, P3 mati 8 ekor, maka analisa data dilakukan 2 kali : 1) menganalisa perbedaan skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis semua mencit yang telah diterapi / *Intention to treat analysis* (waktu kematian mencit diabaikan), 2) menganalisa perbedaan skor aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis yang diterminasi sesuai jadwal penelitian/*perprotocol analysis*, semua data diolah secara statistik dengan menggunakan alat bantu program komputer SPSS.

Data aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis, merupakan skala rasio. Dilakukan analisa deskriptif ditampilkan dalam bentuk mean, median, modus dan simpangan baku, selanjutnya dinilai memiliki sebaran normal atau tidak dengan menilai histogram, box plot. Selanjutnya dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Data memiliki distribusi normal dan varians sama dilanjutkan dengan uji beda hipotesis *One Way Anova*, kemudian dilakukan uji beda antar kelompok dengan menggunakan LSD. Data distribusi tidak normal atau varians tidak sama dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, kemudian dilakukan uji beda antar kelompok, menggunakan *Mann-Whitney*

Nilai p bermakna bila $p < \alpha$ (0,05).

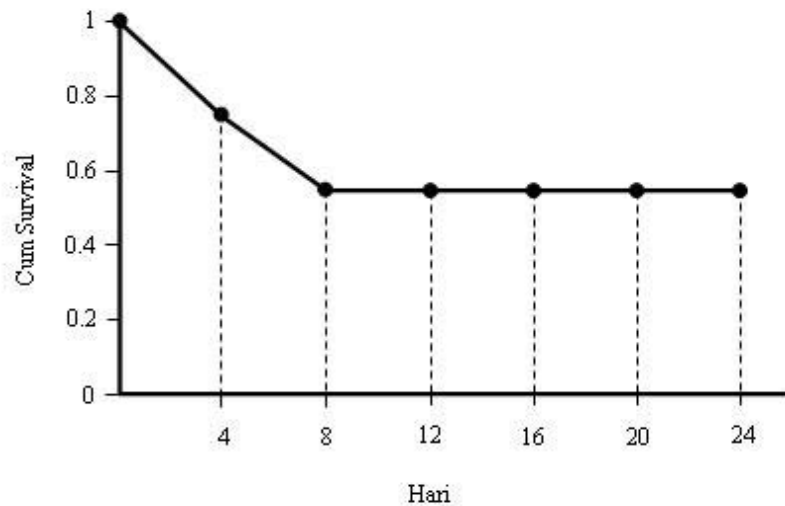
BAB V

HASIL PENELITIAN

Jumlah sampel pada awal penelitian tiap kelompok adalah 7 ekor mencit. Pada minggu kedua, jumlah sampel yang masih hidup adalah 7 ekor pada kelompok kontrol (K), 6 ekor pada kelompok perlakuan 1 (P1), dan masing-masing 3 ekor pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Pada minggu ke tiga, jumlah sampel kelompok K dan P1 yang masih hidup tetap sama dengan minggu kedua, tetapi semua mencit P3 mati 6 ekor dan tinggal 1 ekor, karena kondisinya lemah maka dilakukan terminasi sehingga mencit pada perlakuan 3 mati semua, P2 tinggal dua ekor mencit saja yang masih tetap hidup. Karena sampel mencit P2 dan P3 banyak yang mati, maka dilakukan penelitian organ gaster, hepar dan ren untuk melihat efek samping ekstrak etil asetat *Alpinia galanga*.

Tabel 5.a Jumlah sample pada awal sampai akhir penelitian.

Kelompok	Awal Penelitian (Inokulasi)	Minggu I (awal perlakuan)	Minggu II (minggu I Perlakuan)	Minggu III (minggu II perlakuan)
K	7	7	7	7
P1	7	7	6	6
P2	7	7	3	2
P3	7	7	3	0



Gambar 5.b Grafik Survival analisis

Keterangan :

Sampai hari ke-4 mencit mati 7 ekor , sampai hari ke-8 mencit mati 13 ekor, sisa mencit sampai akhir penelitian 15 ekor.

5.1 Ekstraksi ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* (rimpang lengkuas)

Dari penelitian Herla, dalam menentukan pelarut *Alpinia galanga* untuk mendapatkan ACA (1' asetoksi khavikol asetat) tertinggi dengan pelarut yang tidak beracun digunakan pelarut etil asetat. Untuk penelitian diperlukan kurang lebih 0,713 kg Lengkuas merah untuk masa penelitian 20 hari dengan perhitungan 40 ekor mencit C3H. Lengkuas dipotong-potong, kemudian dikeringkan dengan oven 50°C, setelah menjadi kering dihaluskan sampai menjadi serbuk 178,125 gr (tinggal kira-kira 25% berat awal, karena lengkuas mengandung 75% air), kemudian dilarutkan dalam etil asetat dengan alat soklet menjadi filtrat etil asetat. Selanjutnya diuapkan

dengan vacuum rotary evaporator menjadi crude, menjadi 7,125 gr (tinggal kira-kira 4% berat serbuk). Kemudian dibuat larutan 0,2 ml mengandung dosis 225 mg/kgBB, 450 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB.¹⁷

5.2 Inokulasi sel adenokarsinoma mamma

Untuk menumbuhkan sel adenokarsinoma mamma pada hewan coba, digunakan metode inokulasi (penanaman sel adenokarsinoma) dengan cara : tumor mamma dari mencit donor dicacah menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml. Bubur tumor disuntikkan subkutan diaksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin, yang berisi kurang lebih 10^6 sel tumor hidup. Setelah melalui masa laten kurang lebih satu minggu akan tampak masa tumor ditempat suntikan. Pada penelitian ini pada hari ke tujuh sudah didapatkan massa tumor pada semua binatang coba. Pengukuran panjang dan lebar tumor dengan kaliper (mm). Untuk pengukuran volume tumor menggunakan rumus: $(\text{panjang} \times \text{lebar}^2)/2$.^{57,58,59}

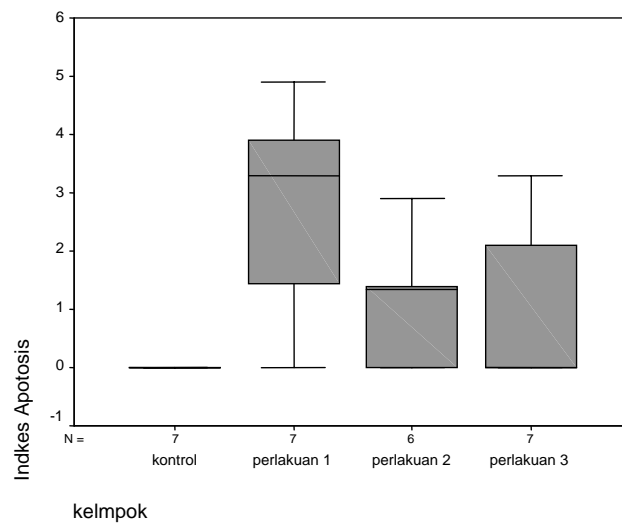
Rerata volume tumor pada awal penelitian kelompok K ($39,6 \pm 15,8$) mm^3 , P1 ($54,7 \pm 47,2$) mm^3 , P2 ($36,3 \pm 7,1$) mm^3 , P3 ($33,2 \pm 13,6$) mm^3

Tabel 5.2 Rerata volume setelah 7 hari inokulasi.

Kelompok	Volume awal (mm^3)
Kontrol	$39,6 \pm 15,8$
Perlakuan 1	$54,7 \pm 47,2$
Perlakuan 2	$36,3 \pm 7,1$
Perlakuan 3	$33,2 \pm 13,6$

5.3 Indeks apoptosis semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*)

Hasil uji normalitas Indeks apoptosis semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*) menunjukkan distribusi indeks apoptosis tidak normal $p=0,00$ ($p<0,05$), maka dilakukan uji nonparametrik. Berdasarkan hasil uji distribusi data tersebut, uji hipotesis menggunakan *Kruskal wallis*.



Tabel 5.3.1 Indeks apoptosis semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*)

Hasil uji Kruskal wallis terdapat perbedaan bermakna ($p=0,011$) menandakan terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis diantara kelompok penelitian, selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui secara pasti kelompok-kelompok yang memiliki beda bermakna.

Tabel 5.3.2 Rerata Indeks apoptosis semua mencit (*Intention to treat analysis*/waktu kematian mencit diabaikan)

	N	Rerata \pm SD	Median
Kontrol	7	0,00 \pm 0,00	0,0000
Perlakuan 1	7	2,70 \pm 1,81	3,3000
Perlakuan 2	6	1,17 \pm 1,08	1,3500
Perlakuan 3	7	1,07 \pm 1,44	0,0000
P [#]		0,011	

Ket. : [#]Kruskal Wallis $p < 0,05$

Rerata indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang tertinggi pada kelompok P1 adalah $2,70 \pm 1,81$, diikuti kelompok P2 adalah $1,17 \pm 1,08$ dan terendah kelompok P3 adalah $1,07 \pm 1,44$. (Tabel 5.3.2).

Tabel 5.3.3 Hasil uji beda indeks apoptosis antar kelompok pada semua mencit (*Intention to treat analysis*)

Antar kelompok	P
K- P1	,003
K- P2	,014
K- P3	,062
P1- P2	,114
P1- P3	,067
P2- P3	,880

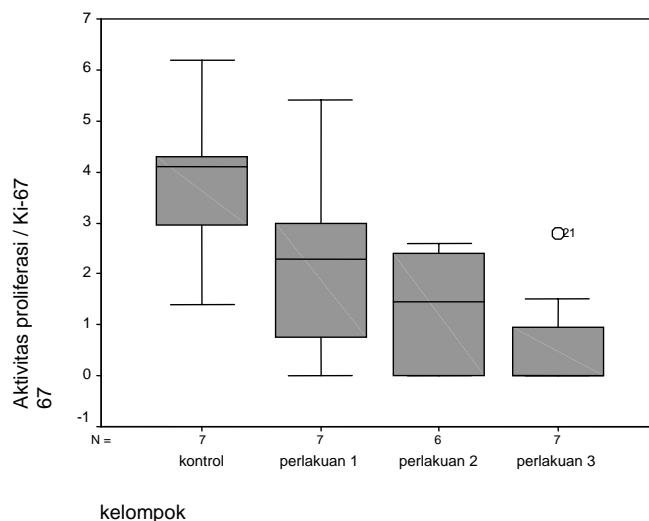
Mann-whithney test

Rerata Indeks apoptosis pada kelompok P1 adalah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok K ($p=0,003$) dan hal yang sama didapatkan pada perbandingan antara kelompok P2 dengan K ($p=0,014$).

Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok K dengan P3 ($p=0,062$), P1 dengan P2 ($p=0,114$), P1 dengan P3 ($p=0,067$) dan P2 dengan P3 ($p=0,88$).

5.4 Aktivitas proliferasi semua mencit (*Intention to treat analysis / waktu kematian mencit diabaikan*)

Hasil uji normalitas aktivitas proliferasi semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*), distribusi aktivitas proliferasi tidak normal $p=0,22$ ($p<0,05$), maka dilanjutkan dengan uji non parametrik. Berdasarkan hasil uji distribusi data tersebut, uji hipotesis menggunakan *Kruskal wallis*.



Tabel 5.4.1 Aktivitas proliferasi semua mencit (*Intention to treat analysis / waktu kematian mencit diabaikan*)

Hasil uji Kruskal wallis terdapat perbedaan bermakna ($p=0,017$) menandakan terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis diantara kelompok penelitian, selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui secara pasti kelompok-kelompok yang memiliki beda bermakna.

Tabel 5.4.2 Rerata Aktivitas proliferasi semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*)

Kelompok	N	Rerata \pm SD	Median
Kontrol	7	37,43 \pm 15,49	41,00
Perlakuan 1	7	21,71 \pm 19,01	23,00
Perlakuan 2	6	13,17 \pm 11,77	14,50
Perlakuan 3	7	6,71 \pm 10,87	0,00
P [#]		0,017	

Ket. : [#] *Kruskal Wallis* $p<0,05$

Aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang terendah pada kelompok P3 adalah 6,71 \pm 10,87, diikuti kelompok P2 adalah 13,17 \pm 11,77 dan kelompok P1 adalah 21,71 \pm 19,01, paling tinggi pada kelompok Kontrol adalah 37,43 \pm 15,49.

Tabel 5.4.3 Hasil uji beda aktivitas proliferasi antar kelompok

(*Intention to treat analysis*)

Antar kelompok	P
K- P1	,109
K- P2	,022
K- P3	,005
P1- P2	,429
P1- P3	,102
P2- P3	,367

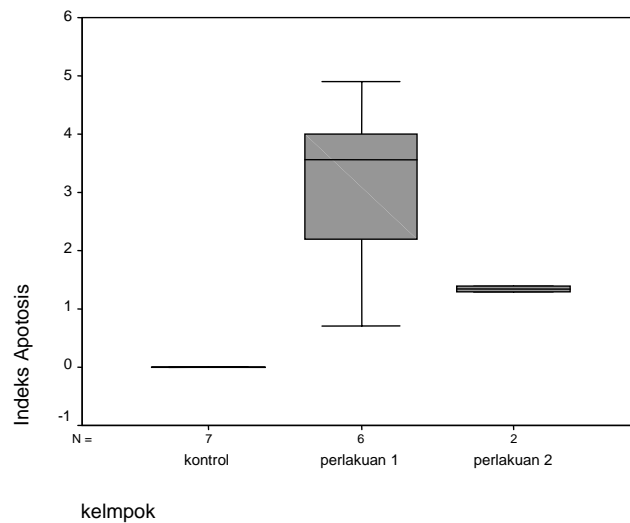
Mann-whithney test

Rerata aktivitas proliferasi pada kelompok Kontrol adalah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok P2 ($p=0,022$) dan hal yang sama didapatkan pada perbandingan antara kelompok kontrol dengan P3 ($p=0,005$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok K dengan P1 ($p=0,109$), P1 dengan P2 ($p=0,429$), P1 dengan P3 ($p=0,102$), P2 dengan P3 ($p=0,367$). (Tabel 5.4.3).

5.5 Perbedaan indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*)

Indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi pada sel adenokarsinoma mammae mencit C3H pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian, maka evaluasi tinggal 3 kelompok, karena pada kelompok P3 mencit mati semua.

Uji normalitas indeks apoptosis pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*), distribusi indeks apoptosis tidak normal $p=0,04$ ($p<0,05$), maka dilanjutkan dengan uji non parametrik. Berdasarkan hasil uji distribusi tersebut, uji hipotesis menggunakan *Kruskal wallis*.



Tabel 5.5.1 Indeks apoptosis pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*)

Hasil uji Kruskal wallis terdapat perbedaan bermakna ($p=0,002$) menandakan terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis diantara kelompok penelitian, selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui secara pasti kelompok-kelompok yang memiliki beda bermakna.

Tabel 5.5.2 Rerata Indeks apoptosis pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*)

Kelompok	<i>Indeks Apoptosis</i>	
	Rerata \pm SD	Median
Kontrol	0,00 \pm 0,00	0,00
Perlakuan 1	2,70 \pm 1,50	3,55
Perlakuan 2	1,35 \pm 0,07	1,35
p [#]	0,002	

Ket. : [#] Kruskal Wallis $p < 0,05$

Hasil uji Kruskal wallis menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p=0,002$) indeks apoptosis diantara kelompok K, P1 dan P2. (Tabel 5.5.2) Rerata indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang tertinggi pada kelompok P1 adalah $2,70 \pm 1,50$, pada kelompok P2 adalah $1,35 \pm 0,07$.

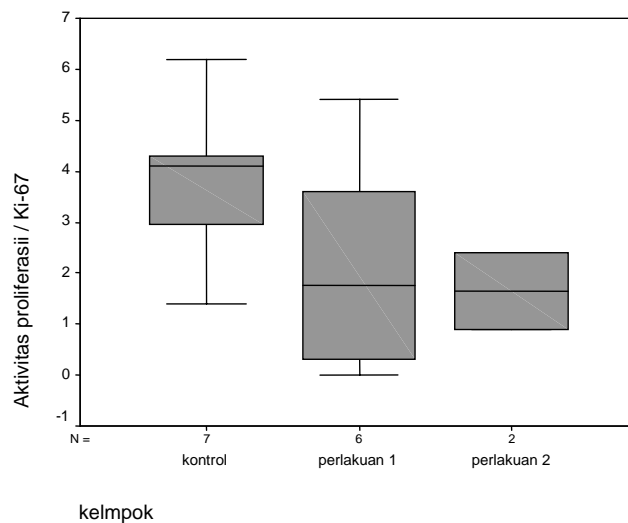
Rerata Indeks apoptosis pada kelompok P1 adalah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok K ($p=0,001$) dan hal yang sama didapatkan pada perbandingan antara kelompok P2 dengan kontrol ($p=0,005$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok P1 dengan P2 ($p=0,182$).

Tabel 5.5.3 Hasil uji beda indeks apoptosis antar kelompok (*Per Protocol Analysis*)

Antar kelompok	<i>P</i>
K- P1 ^(*)	,001
K- P2 ^(*)	,005
P1-P2 ^(*)	,182

(*) *Mann-whithney test*

Uji normalitas aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*), distribusi data aktivitas proliferasi normal $p=0,770$ ($p>0,05$). Berdasarkan hasil uji distribusi data tersebut, uji hipotesis menggunakan *One Way Anova*, kemudian dilakukan uji beda antar kelompok dengan menggunakan LSD.



Tabel 5.5.4 Aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*)

Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,198$) jumlah proliferasi diantara ketiga kelompok (Tabel 5.5.5).

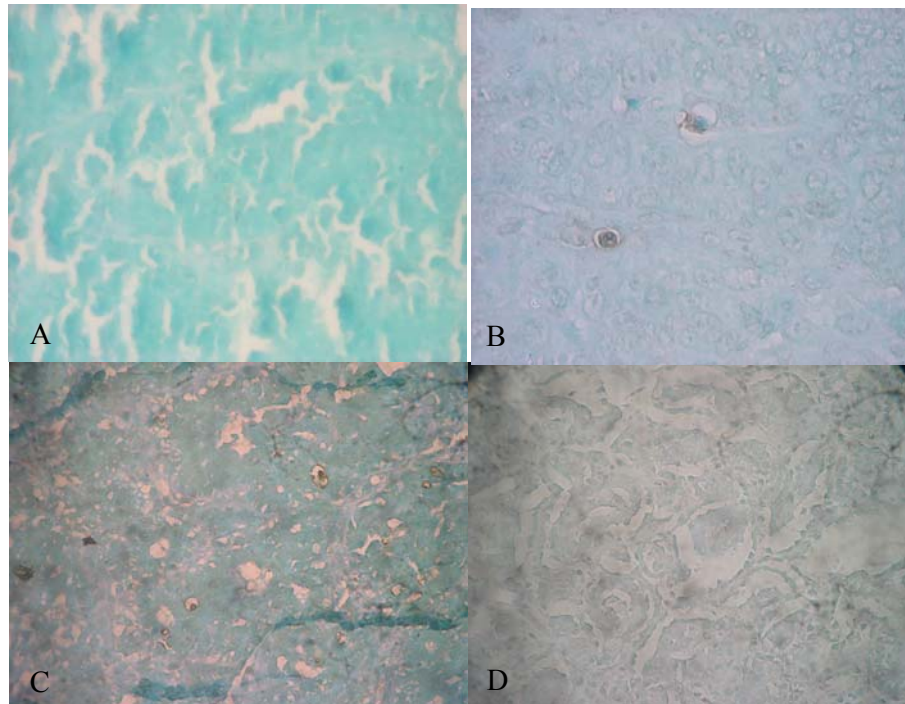
Tabel 5.5.5 Rerata Aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*)

Kelompok	N	Jumlah Proliferasi	
		Rerata \pm SD	Median
Kontrol	7	37,4 \pm 15,5	41,00
Perlakuan 1	6	21,3 \pm 20,8	17,50
Perlakuan 2	2	16,5 \pm 10,6	16,50
P [#]		0,198	

Ket. : [#] *One Way Anova* $p<0,05$

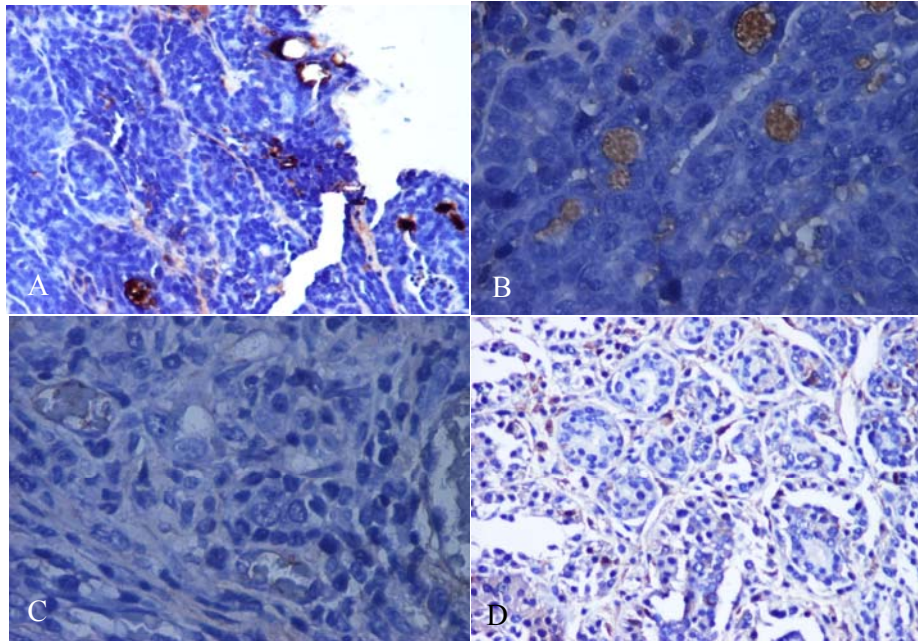
Aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang terendah pada kelompok P2 adalah 16,5 \pm 10,6, diikuti kelompok P1 adalah 21,3 \pm 20,8 paling tinggi pada kelompok Kontrol 37,4 \pm 15,5.

5.6 Gambaran mikroskopik hasil penelitian



Gambar 5.6.1 Pewarnaan imunohistokimia untuk sel apoptosis menggunakan Tunel, ditunjukkan adanya pewarnaan coklat pada inti yang mengalami penyusutan/*shinkage* dan dikelilingi oleh halo jernih.

- A. Kelompok K, tak didapatkan sel apoptosis
- B. Kelompok P1, didapatkan apoptosis
- C. Kelompok P2, didapatkan apoptosis
- D. Kelompok P3, sel tumor berkurang, sedikit apoptosis



Gambar 5.6.2 Pewarnaan Imunohistokimia sel Proliferasi menggunakan Ki67 ditunjukkan dengan pewarnaan coklat pada inti.

- A. Kelompok Kontrol, tampak aktivitas proliferasi, score Allred ($2+3=5$)
- B. Kelompok P1, tampak aktivitas proliferasi, score Allred ($2+2=4$)
- C. Kelompok P2, tampak aktivitas proliferasi Allred score ($1+1=2$)
- D. Kelompok P3, tidak tampak aktivitas proliferasi, sel tumor berkurang

5.7 Evaluasi efek samping *Alpinia galanga* pada organ gaster, ren dan hepar

Evaluasi organ gaster, dengan menilai gastritis yang merupakan respon terhadap iritan alkohol maupun obat. Bahan-bahan ini akan menyebabkan gastritis akut maupun gastritis kronis. Secara mikroskopis didapatkan perubahan pada mukosa gaster antara lain: sebaran sel radang pada mukosa dan submukosa, hiperplasi mukosa, mukus metaplasia (berkurangnya sel parietal dan Chief sel digantikan sel mukus). Evaluasi dilakukan menilai kardia dan fundus, masing-masing 10 lapangan pandang, selanjutnya dilakukan grading^{5,53} (lampiran 10). Penilaian efek samping lengkuas pada hepar dengan menilai kerusakan sel hepar, dengan menilai derajat degenerasinya dengan pembesaran 400x pada 10 lapangan pandang.^{5,51,54} (Lampiran 11). Penilaian efek samping Lengkuas pada Ginjal mencit C3H, dengan melihat tubulus proksimal ginjal menggunakan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang. Pada setiap lapangan pandang dihitung jumlah tubulus proksimal yang mengalami penutupan karena edema, kemudian dilakukan grading.^{5,52,55} (Lampiran 12)

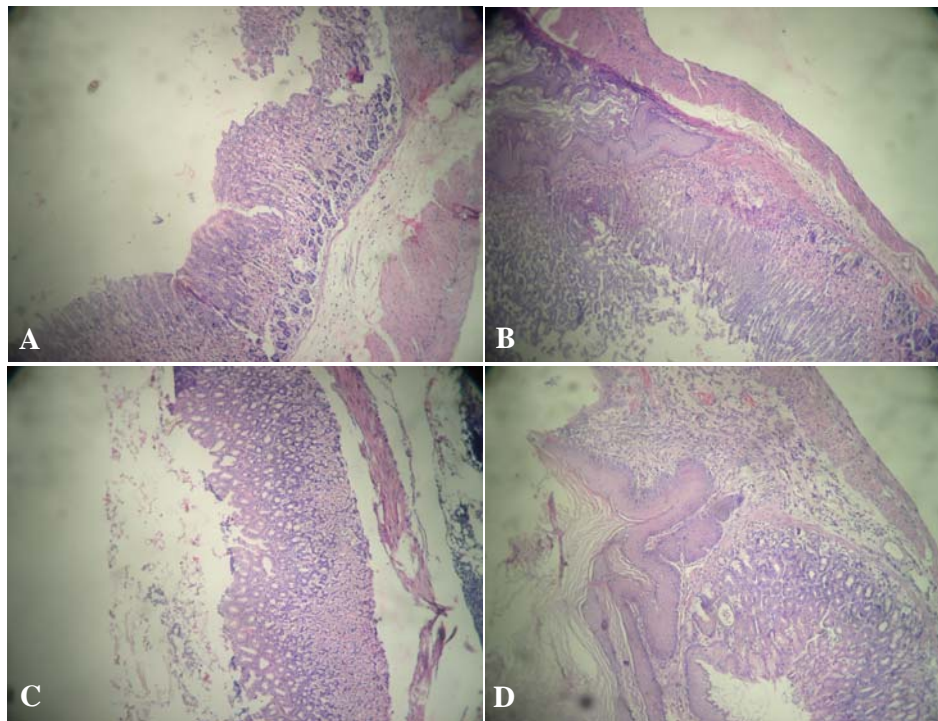
Tidak terdapat perbedaan bermakna efek samping pada organ gaster ($p=0,427$) dan organ hepar ($p=0,180$) diantara ke-4 kelompok (Tabel 5.7). Terdapat perbedaan bermakna efek samping pada organ ren ($p=0,001$). Efek samping pada organ ren kelompok K lebih kecil secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok P1 ($p=0,000$), kelompok P2 ($p=0,037$) dan

kelompok P3 ($p=0,003$). Tidak bermakna pada P1 dibanding P2 ($p=0,058$), P1 dibanding P3 ($p=0,088$) dan P2 dibanding P3 ($p=0,588$)

Tabel 5.7 Efek samping pada gaster, ren dan hepar

Kelompok	<i>Gaster</i>		<i>Ren</i>		<i>Hepar</i>	
	Rerata \pm SD	Medi-an	Rerata \pm SD	Medi-an	Rerata \pm SD	Medi-an
Kontrol	16,6 \pm 9,2	13	16,0 \pm 4,2	15	265 \pm 46,6	293
Perlakuan 1	23,5 \pm 8,9	22	31,6 \pm 7,0	35	250 \pm 24,3	245
Perlakuan 2	24,3 \pm 9,8	30	24,0 \pm 4,6	23	233 \pm 26,4	238
Perlakuan 3	18,3 \pm 8,4	18	26,0 \pm 4,5	26	293 \pm 50,0	280
P	0,427		0,001		0,180	

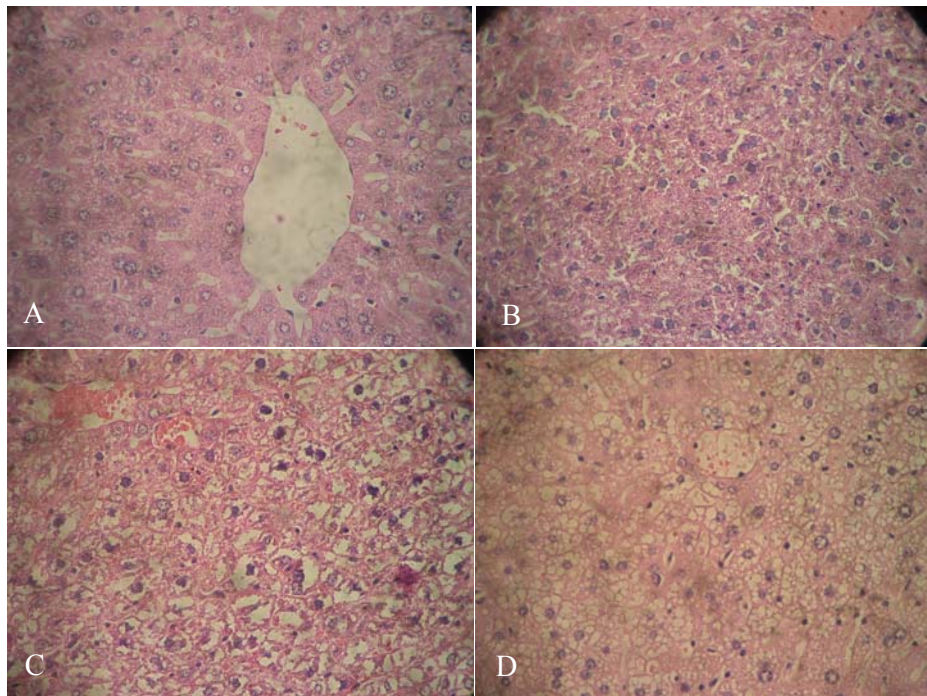
Keterangan : One Way Anova; ^{a,b,c} LSD $p<0,05$



Gambar 5.7.1 Efek samping di Gaster, dinilai metaplasia, hiperplasia dan infiltrasi sel radang.

A. Gambaran gaster kelompok K

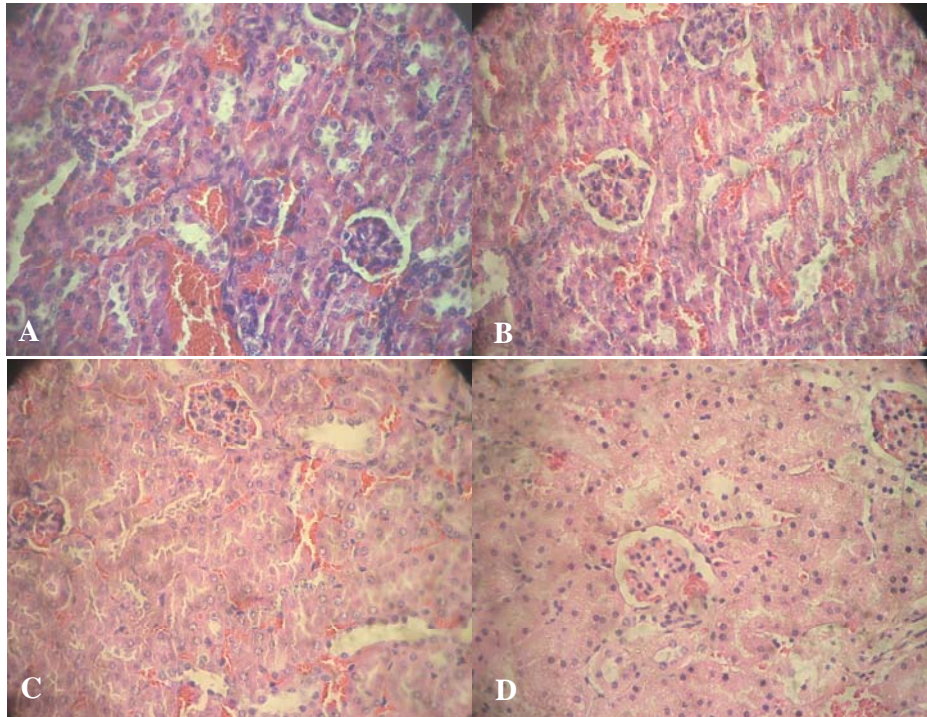
- B. Gambaran gaster kelompok P1
- C. Gambaran gaster kelompok P2
- D. Gambaran gaster kelompok P3



Gambar 5.7.2 Efek samping di Hepar, gangguan pada hepar ditampakkan adanya derajat degenerasi sel hepar, mulai sel normal, degenerasi parenchymatosa, degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis.

- A. Gambaran hepar, kelompok kontrol, sebagian tampak degenerasi parenkimatosa, sebagian degenerasi hidrofik.
- B. Gambaran hepar kelompok P1, sebagian tampak degenerasi parenkimatosa sebagian degenerasi hidrofik.
- C. Gambaran hepar kelompok P2, sebagian kecil masih tampak degenerasi parenkimatosa sebagian besar degenerasi hidrofik.

- D. Gambaran hepar kelompok P3 menampakkan adanya gambaran degenerasi lemak.



Gambar 5.7.3 Efek samping di ginjal, dengan menilai gambaran tubulus proksimal yang mengalami penutupan karena intersisial edema.

- A. Gambaran ginjal, kelompok kontrol, sebagian besar tubulus proksimal normal.
- B. Gambaran ginjal kelompok P1, sebagian tampak lumen tubulus proksimal mengalami penutupan karena edema.
- C. Gambaran ginjal kelompok P2, tampak sebagian besar lumen tubulus proksimal mengalami penutupan karena edema.
- D. Gambaran ginjal kelompok P3, tampak sebagian lumen tubulus proksimal mengalami penutupan karena edema.

5.8 Berat badan dan volume tumor mencit

Tidak terdapat perbedaan berat badan mencit diantara ke empat kelompok pada awal penelitian ($p=0,548$), minggu ke 1 ($p=0,282$) dan minggu ke-3 ($p=0,251$). Berat badan mencit hanya berbeda bermakna ($p=0,048$) pada minggu ke 2 penelitian (Tabel 5.8.1). Pada uji beda antar kelompok pada berat badan mencit minggu ke dua, didapatkan hasil beda bermakna antara kelompok P2 dengan K ($p=0,022$) dan antara kelompok P2 dengan kelompok P1 ($p=0,033$).

Rerata berat badan mencit Rerata pada awal penelitian, kelompok K adalah $(18,5 \pm 3,08)$ g sedangkan, Kelompok P1 adalah $(19,9 \pm 2,96)$ g, kelompok P2 adalah $(19,1 \pm 1,21)$ g dan kelompok P3 adalah $(20,3 \pm 2,03)$ g. Dibandingkan rerata berat badan mencit pada minggu ke 2 adalah kelompok K adalah $20,31 \pm 2,58$, P1 adalah $20,12 \pm 3,89$, P2 adalah $15,33 \pm 1,04$, P3 adalah $16,30 \pm 0,75$, terjadi penurunan berat badan secara bermakna. (Tabel 5.8.1). Penurunan berat badan terutama pada kelompok P2 dan P3.

Tabel 5.8.1 Perbedaan rerata (\pm sd) berat badan (g) dari awal sampai akhir penelitian

Kelompok	Berat awal	Berat Minggu 1	Berat Minggu 2	Berat Minggu 3
Kontrol	$18,5 \pm 3,08$	$19,8 \pm 2,88$	$20,3 \pm 2,58^b$	$20,8 \pm 2,61$
Perlakuan 1	$19,9 \pm 2,96$	$21,3 \pm 2,80$	$20,0 \pm 3,90^c$	$19,8 \pm 3,32$
Perlakuan 2	$19,1 \pm 1,21$	$19,2 \pm 1,40$	$15,3 \pm 1,04^{b,c}$	$16,8 \pm 0,71$
Perlakuan 3	$20,3 \pm 2,03$	$21,3 \pm 2,19$	$16,3 \pm 0,76$	
p^a	0,548	0,282	0,048	0,251

Keterangan : ^a One Way Anova; ^b LSD $p < 0,05$; ^c LSD $p < 0,05$

Tidak terdapat perbedaan volume tumor mencit (Tabel 5.8.2) pada awal penelitian ($p=0,736$) dan akhir penelitian ($p=0,142$), namun terdapat perbedaan bermakna volume tumor mencit seminggu setelah diberi ekstrak lengkuas ($p=0,002$).

Tabel 5.8.2 Perbedaan volume tumor (satuan mm^3) dari awal sampai akhir penelitian

Kelompok	<i>Volume</i> awal	<i>Volume</i> Minggu 1	<i>Volume</i> Minggu 2
Kontrol	$39,6 \pm 15,8$	$72,1 \pm 42,2$ ^{a, b}	$951,8 \pm 1121$
Perlakuan 1	$54,7 \pm 47,2$	$44,6 \pm 29,2$ ^{c, d}	$223,2 \pm 240,8$
Perlakuan 2	$36,3 \pm 7,1$	$19,2 \pm 9,3$ ^{a, c}	$214,1 \pm 114,7$
Perlakuan 3	$33,2 \pm 13,6$	$14,4 \pm 16,1$ ^{b, d}	
$p^{\#}$	0,736	0,002	0,142

Keterangan : [#] Kruskal Wallis; ^{a,b,c,d} Mann Whitney $p < 0,05$

5.9 Grading Tumor

Tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,076$) grading tumor diantara ke-4 kelompok. Namun karena nilai p yang hampir bermakna, tetap diikuti oleh uji beda pada masing-masing kelompok, didapatkan beda bermakna pada P2 dibandingkan kelompok K ($p=0,035$) (Tabel 5.9).

Tabel 5.9 Rerata grading tumor

Kelompok	Grading Tumor	
	Rerata \pm SD	Median
Kontrol	$21,00 \pm 7,48$ ^a	19,0
Perlakuan 1	$19,29 \pm 7,91$	19,0
Perlakuan 2	$13,20 \pm 2,77$ ^a	12,0
Perlakuan 3	$12,50 \pm 4,36$	10,5
$p^{\#}$	0,076	

Ket. : [#] Kruskal Wallis $p < 0,05$

5.10 Penghitungan LD50

Dari hasil penelitian dengan menggunakan ekstrak Lengkuas pada hewan percobaan mencit C3H, didapatkan banyak mencit yang mati sebelum masa penelitian berakhir. Pada kelompok P1 mati 1 ekor, kelompok P2 mati 4 ekor, kelompok P3 mati 6 ekor tinggal 1 ekor tidak sehat maka dilakukan terminasi sebelum masa penelitian berakhir. maka dilakukan analisis probit untuk mengetahui dosis yang aman untuk dikonsumsi.

Tabel. 5.10.1 Persentase kematian mencit untuk menentukan LD50

Konsentrasi (mg/kgBB)	Jumlah mencit	Jumlah mortalitas	% Kematian
750	7	7	100%
450	7	5	71,42%
225	7	1	14,28%

Tabel 5.10.2 Analisa probit pada penentuan LD50

Konsentrasi (mg/kgBB)	% kematian	probit
750	100%	8,09
450	71,42%	5,55
225	14,28%	3,92

Dari hasil penelitian dihasilkan LD50 ekstrak lengkuas dengan pelarut etil asetat pada mencit C3H menurut metode Musyidi (1985), berdasarkan analisis probit diperoleh persamaan probit $(p) = - 15,707 + 6,188 X$, maka didapatkan LD50 adalah sebesar 345 mg/Kg berat badan. Jika menginginkan probabilitas hanya satu saja yang mati maka dosis lengkuas yang aman adalah 145 mg/Kg berat badan. (Lampiran 13 hal 123)

5.12 Perhitungan nilai *Kappa* (*k*)

Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang andal (*reliabilitas*) dan sah (*validitas*) pengukuran indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi diukur oleh dua pembaca. Untuk menilai keandalan dan kesahihan kedua data dilakukan penentuan nilai *Kappa*. Nilai *Kappa* untuk aktivitas proliferasi adalah 0,81 dan nilai *Kappa* untuk indeks apoptosis adalah 0,85.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian menggunakan 28 ekor mencit C3H yang dibagi menjadi 4 kelompok (Kontrol (K), dosis 225 mg/KgBB/hari (P1), dosis 450 mg/KgBB/hari (P2) dan dosis 750 mg/KgBB/hari (P3)). Pada minggu kedua jumlah sampel hidup pada kelompok K terdapat 7 ekor (hidup semua), kelompok P1 terdapat 6 ekor (mati 1 ekor), Kelompok P2 terdapat 3 ekor (mati 4 ekor) dan kelompok P3 terdapat 3 ekor (mati 4 ekor). Pada minggu ketiga jumlah sampel kelompok K dan P1 yang masih hidup sama dengan minggu kedua, P2 yang hidup tinggal 2 ekor, pada P3 mencit tinggal 1 ekor dan sudah tidak sehat maka dilakukan terminasi sehingga kelompok P3 mati 7 ekor (mati semua). Penelitian tetap diteruskan sampai akhir jadwal penelitian, dengan mengevaluasi penyebab kematian mencit. Untuk mengetahui efek samping dari ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* dilakukan evaluasi organ hepar, ginjal dan gaster.

Penentuan dosis menggunakan penelitian Herla dengan dosis ekstrak etil asetat lengkuas 750mg/Kg BB, yang memberikan gambaran mikroskopis paling baik pada karsinoma tubular padat mamma (berdasarkan penilaian pleomorfisme sel, inti hiperkromatin, jumlah mitosis dan bentuk tubular, berdasarkan skoring Lesio). Dosis LD₅₀ ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* 765 mg/KgBB. Dari dosis tersebut maka ditentukan dosis bertingkat ekstrak etil asetat *Alpinia galanga*

yaitu dosis kecil 225 mg/KgBB, dosis sedang 450 mg/KgBB dan dosis tinggi 750 mg/KgBB.¹⁷

6.1 Inokulasi sel adenokarsinoma mamma

Untuk menumbuhkan sel adenokarsinoma mamma pada hewan coba, digunakan metode inokulasi (penanaman sel adenokarsinoma).

Pertumbuhan sel tumor terjadi karena DNA yang telah diekstraksi dari sel tumor dan dipotong-potong menjadi beberapa fragmen, kemudian ditransfer ke mencit melalui *cell line*, selanjutnya digabungkan dengan *genome*, akan menghasilkan sel yang mengalami transformasi karena kehilangan kontak untuk inhibisi. Sel yang mengalami transformasi dapat menghasilkan sel tumor ketika diinjeksikan melalui atymic mencit. Genome yang dari sel yang mengalami transformasi mengandung onkogen. Terjadinya tumor disebabkan adanya *chromosome translocation*. Translokasi kromosom diidentifikasi sebagai onkogen.^{5,27,28}

6.2 Pengaruh pemberian Ekstrak *Alpinia galanga* terhadap indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H

Keseimbangan sel pada jaringan (*Tissue Homeostasis*) dipengaruhi keseimbangan proliferasi sel dan apoptosis, tiap sel mempunyai kemampuan untuk mempertahankan jumlah sel dalam keadaan normal (berintegitas dengan *genome*). Bila terjadi ketidak seimbangan proliferasi dan apoptosis maka akan terjadi perkembangan perkembangan tumor.^{5,6,7}

Ekstrak *Alpinia galanga* mengandung ACA ((1' acetoxyl chavicol acetate), dimana dari penelitian terdahulu membuktikan: 1) menghambat proses inflamasi melalui penghambatan *Nitric oxide (NO)*, *Cyclooxygenase-2 (COX)-2* dan menghilangkan radikal bebas (antioksidan). Proses inflamasi akan menyebabkan kerusakan protein (*DNA repair, caspase*) yang akan menyebabkan kerusakan DNA dan mutasi, sehingga dapat menginduksi sel tumor berkembang menjadi sel ganas (gangguan proliferasi). 2) menginduksi apoptosis melalui metabolisme *polyamine* dan aktivasi *caspase-3*. 3) menghambat NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*). NF- κ B bila teraktivasi akan menekan apoptosis dan gangguan proliferasi.^{17,19,21,23,25} Proliferasi sel dapat dinilai dengan Ki67 yang mengekspresikan tiap fase pada siklus sel. Sel apoptosis dapat di deteksi menggunakan Tunel.^{7,8,9,10,11}

Rerata Indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae pada semua mencit (*Intention to treat analysis/* waktu kematian mencit diabaikan), tertinggi pada kelompok P1, diikuti kelompok P2 dan terendah pada kelompok P3. Terdapat perbedaan bermakna di antara ke-4 kelompok ($p=0,011$). Hasil pengujian antar kelompok percobaan, terdapat perbedaan bermakna pada kelompok P1 dengan pemberian dosis ekstrak *Alpinia galanga* 5,625 mg (225 mg/kgBB/hari) dibanding dengan kelompok K, kelompok P2 dengan pemberian dosis ekstrak *Alpinia galanga* 11,25 mg (450 mg/KgBB/hari) dibanding dengan kelompok K. Indeks apoptosis tidak bermakna pada kelompok P3 pada dosis ekstrak *Alpinia galanga* 18,75 mg (750 mg/Kg BB/hari) dibanding dengan kelompok K. Hal ini menunjukkan

bahwa ekstrak *Alpinia galanga* menginduksi terjadinya apoptosis. Dengan dosis 225 mg/kgBB/hari pada kelompok P1 sudah menampilkan aktivitas apoptosis. Peningkatan dosis pada kelompok P2 dan P3 tidak diikuti peningkatan rerata indeks apoptosis. Didapatkan perbedaan tidak bermakna antara kelompok P2 dengan P3, K dengan P3, P1 dengan P2, dan P1 dengan P3. Jadi peningkatan dosis tidak berpengaruh pada peningkatan indeks apoptosis.

Rerata aktivitas proliferasi pada semua mencit (*Intention to treat analysis/* waktu kematian mencit diabaikan) yang terendah pada kelompok P3, diikuti kelompok P2 dan P1 paling tinggi pada kelompok K. Hasil pengujian antar kelompok percobaan Terdapat perbedaan bermakna diantara ke-4 kelompok ($p=0,017$). Perbedaan bermakna pada kelompok P2 dengan pemberian dosis ekstrak *Alpinia galanga* 11,25 mg (450 mg/kgBB) dibanding dengan kelompok K, kelompok P3 dengan pemberian dosis ekstrak *Alpinia galanga* 18,75 mg (750 mg/kgBB) dibanding dengan kelompok K. Aktivitas proliferasi tidak bermakna pada kelompok P1 pada dosis ekstrak lengkuas 5,625 mg (225 mg/kgBB) dibandingkan dengan kelompok K. Dari rerata kelompok P1 dibandingkan K sudah menampilkan penurunan aktivitas proliferasi, tetapi secara statistik tidak bermakna. Peningkatan dosis pada P2 dibanding K menghasilkan penurunan aktivitas proliferasi yang bermakna. Peningkatan dosis P3 dibanding K menghasilkan aktivitas proliferasi yang bermakna. Rerata aktivitas proliferasi P2 dibandingkan P3 didapatkan penurunan, meskipun secara statistik tidak

bermakna (pada pengujian antar kelompok tidak terdapat perbedaan bermakna antara P2 dibanding P3, K dengan P1, P1 dengan P2, P1 dengan P3, P2 dengan P3). Jadi dapat disimpulkan ekstrak Lengkuas 450 mg/kgBB/hari dapat menghambat aktivitas proliferasi, bila dosis dinaikkan terjadi penurunan rerata aktivitas proliferasi, meskipun secara statistik tidak bermakna.

Indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diterminasi sesuai jadwal penelitian / *perprotocol analysis*, rerata indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang tertinggi pada kelompok P1 diikuti, pada kelompok P2. Terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis diantara kelompok K dengan kelompok P1 dan P2. Ekstrak lengkuas berpengaruh pada indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mammae. Peningkatan dosis tidak diikuti peningkatan rerata indeks apoptosis, tampak tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok P1 dengan P2. Dengan dosis 225 mg /kgBB/hari pada perlakuan P1 sudah menampilkan apoptosis.

Aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diterminasi sesuai jadwal penelitian / *perprotocol analysis*. Rerata yang terendah pada kelompok P2 diikuti kelompok P1, paling tinggi pada kelompok K. Tidak terdapat perbedaan bermakna aktivitas proliferasi diantara ketiga kelompok. Ekstrak lengkuas berpengaruh pada aktivitas proliferasi pada sel adenokarsinoma mammae, meskipun secara statistik tidak didapatkan perbedaan bermakna pada ketiga kelompok. Peningkatan

dosisi dari P1 ke P2 tampak penurunan rerata aktivitas proliferasi, meskipun secara statistik tidak berbeda bermakna. Jadi peningkatan dosisi berpengaruh terhadap aktivitas proliferasi. Dengan dosisi 225 mg /kgBB/hari pada perlakuan P1 sudah menampakkan aktivitas penghambatan aktivitas proliferasi.

Indeks apoptosis semua mencit (*Intention to treat analysis/ waktu kematian mencit diabaikan*) dan yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*), induksi apoptosis sudah tampak pada dosisi 225 mg/kgBB/hari. Peningkatan dosisi ekstrak lengkuas tidak mempengaruhi peningkatan indeks apoptosis. Aktivitas proliferasi semua mencit (*Intention to treat analysis/waktu kematian mencit diabaikan*), penghambatan aktifitas proliferasi sel secara statistik bermakna pada dosisi 450 mg/kgBB/hari, tetapi pada dosisi 225 mg/kgBB/hari sudah tampak penurunan rerata aktivitas proliferasi. Peningkatan dosisi diikuti dengan penurunan aktivitas proliferasi. Aktivitas proliferasi pada mencit yang diterminasi sesuai jadwal penelitian (*Per Protocol Analysis*), secara statistik tidak ada beda bermakna, tetapi rerata kelompok kontrol dibandingkan kelompok yang mendapatkan ekstrak lengkuas 225mg/kgBB/hari menampakkan penurunan, begitu juga yang mendapatkan 450mg/kgBB/hari dan 750 mg/kgBB/hari.

Pada penelitian ini ternyata ekstrak Lengkuas dapat meningkatkan apoptosis dan menurunkan aktivitas proliferasi. Peningkatan apoptosis dan penghambatan aktivitas proliferasi, dapat dikarenakan ekstrak lengkuas mengandung ACA, yang dapat meningkatkan apoptosis aktivasi *caspase-3*. Caspase adalah pemecahan protein oleh satu golongan protease, yang dapat mengakibatkan apoptosis selular. Caspase berperan pada *initiation phase* pada jalur terjadinya apoptosis. ACA juga mempunyai efek penghambatan proses inflamasi melalui penghambatan *Nitric oxide (NO)*, *Cyclooxygenase-2 (COX)-2* dan menghilangkan radikal bebas (antioksidan). Proses inflamasi akan menyebabkan kerusakan protein (DNA repair, caspase) yang akan menyebabkan kerusakan DNA dan mutasi, sehingga dapat menginduksi sel tumor berkembang menjadi sel ganas (gangguan proliferasi). Di samping itu ACA juga mempunyai efek menghambat NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*). NF- κ B bila teraktivasi akan menekan apoptosis dan gangguan proliferasi.

Sel apoptosis dengan cepat difagositosis atau di degradasi secara histologik, apoptosis substansial bisa tidak nampak, hal ini diduga yang menyebabkan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan 3 menurun, tetapi secara mikroskopis sel-sel tumor berkurang, juga volume tumor pada kelompok 3 mengecil, tetapi rerata indeks apoptosis menurun.⁵

ACA mempunyai efek penghambatan aktivitas proliferasi, seperti pada penelitian Herla membuktikan penghambatan pertumbuhan sel kanker dalam kultur, baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia, penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel

yang hidup dalam kultur dengan hemositometer. Pada penelitian ini penghambatan proliferasi diduga karena gangguan pengaturan *cyclin*, *cyclin dependent kinase*, dan gangguan pada *check point*. Beberapa *phytochemicals* menunjukkan menghambat kerusakan DNA pada *checkpoint* dan pengaturan siklus sel pada kanker pada .^{35,36,37,39,40,41}

6.3 Evaluasi organ gaster, ren dan hepar untuk mengetahui efek toksisitas ekstrak *Alpinia galanga*

Evaluasi organ gaster, gastritis merupakan respon terhadap iritan etil asetat, alkohol maupun obat. Bahan-bahan ini akan menyebabkan gastritis akut maupun gastritis kronis. Secara mikroskopis didapatkan perubahan pada mukosa gaster antara lain: sebaran sel radang pada mukosa dan submukosa, hiperplasi mukosa, mukus metaplasia (berkurangnya sel parietal dan Chief sel digantikan sel mukus). Dari hasil penelitian didapatkan tidak terdapat perbedaan bermakna pada evaluasi organ gaster ($p=0,454$) diantara kelompok K dengan P1, P2, P3.^{5,53} Jadi *Alpinia galanga* tidak mempunyai efek samping dan toksisitas di gaster, dari penelitian terdahulu membuktikan mempunyai efek *gastroprotective*.⁵⁶

Evaluasi organ hepar, hepar adalah organ yang berperan dalam metabolisme berbagai macam nutrient (termasuk obat dan toksin). Kelainan yang didapatkan pada hepar sebagai *respon injury* tersebut didapatkan degenerasi dan akumulasi intrasel sehingga tampak berbagai tingkatan degenerasi yaitu degenerasi parenkimatos, degenerasi hidrofik (*ballooning degeneration*), degenerasi lemak dan nekrosis. Dari hasil penelitian

didapatkan tidak terdapat perbedaan bermakna pada evaluasi organ hepar ($p=0,282$) diantara Kelompok K dengan P1, P2, P3.^{5,51,54} Jadi ekstrak *Alpinia galanga* tidak mempunyai efek samping atau toksisitas di hepar.

Evaluasi organ ginjal, ginjal adalah organ yang mempunyai fungsi filtrasi glomerulus, reabsorpsi dan sekresi dari tubules. Tubulus proksimal (terdapat mikrovilli) berfungsi reabsorpsi dan filtrasi elektolit, air, glukosa dan protein. Tubulus proksimal mudah terkena kerusakan karena iskemi, toksin yang secara periodik direabsorpsi di tubulus proksimal sehingga paling mudah terkena dari respon dari bahan kimia (*Chemical injury*). Tubulus proksimal yang terjadi kerusakan karena jejas bahan kimia atau obat akan terjadi edema intersisial.^{5,52,55} Terdapat perbedaan bermakna efek samping pada organ ginjal ($p=0,001$). Efek samping pada organ ginjal kelompok K lebih kecil bila dibandingkan dengan P1 ($p=0,001$), P2 ($p=0,037$) dan P3 ($p=0,003$). Jadi *Alpinia galanga* mempunyai efek samping atau toksisitas di ginjal.

6.4 Nilai Kappa (k)

Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang andal (*reliabilitas*) dan sah (*validitas*) pengukuran indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi diukur oleh dua pembaca. Untuk menilai keandalan dan kesahihan kedua data dilakukan penentuan nilai *Kappa*. Nilai *Kappa* untuk aktivitas proliferasi adalah 0,81 dan nilai *Kappa* untuk indeks apoptosis adalah 0,85.

Pada penelitian ini penilaian *kappa* data indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi memberi nilai diatas 0,8 menunjukkan data mempunyai keandalan dan kesahihan sangat baik.

6.5 Grading tumor dan volume tumor.

Tidak terdapat perbedaan bermakna grading tumor diantara ke-4 kelompok. Namun karena nilai p yang hampir bermakna, tetap dilakukan uji beda pada masing-masing kelompok, didapatkan beda bermakna pada P2 dibandingkan kelompok K ($p=0,035$). Jadi pada ekstrak Lengkuas pada dosis 450 mg/kgBB/hari dapat memperbaiki grading tumor.

Evaluasi volume tumor mencit dilakukan tiap minggu, didapatkan perbedaan bermakna volume tumor mencit seminggu setelah diberi ekstrak lengkuas. Didapatkan beda bermakna pada kelompok P2 dibanding K dan kelompok P3 dibanding K. Jadi ekstrak lengkuas pada dosis 450 mg/kgBB dapat mengurangi volume tumor.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

- Pemberian ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis bertingkat (225mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari, 750mg/kgBB/hari) menurunkan aktivitas proliferasi dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma.
- Pada kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) terjadi peningkatan skor aktivitas proliferasi dan tidak didapatkan indeks apoptosis.
- Terdapat penurunan skor aktivitas proliferasi dan peningkatan skor indeks apoptosis pada kelompok yang mendapatkan ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis bertingkat (225mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/ hari, 750mg/kgBB/hari) dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*)
- Dosis 225 mg/kgBB/ hari sudah menampilkan peningkatan indeks apoptosis dan penurunan aktivitas proliferasi sel, maka pada dosis tersebut dapat digunakan untuk terapi adjuvan pada kanker.
- Peningkatan dosis ekstrak lengkuas tidak mempengaruhi peningkatan indeks apoptosis.

- Peningkatan dosis ekstrak lengkuas mempengaruhi penurunan aktivitas proliferasi sel.
- Didapatkan efek toksisitas di ginjal.
- Ekstrak lengkuas pada dosis 450 mg/kgBB dapat mengurangi volume tumor dan memperbaiki grading tumor.

7.2 Saran

- Untuk penelitian selanjutnya disarankan melakukan penelitian dengan dosis bertingkat dengan menggunakan LD50 345 mg/kgBB/hari.
- Perlu eksplorasi lebih lanjut profil senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak lengkuas.
- Perlu penelitian lebih lanjut profil senyawa aktif pada ekstrak lengkuas yang ditanam di Laboratorium Pengujian Nutrisi Bahan baku Obat UNDIP di Institusi Obat Alam Indonesia dibandingkan yang ditanam ditempat lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rosai J. Breast. In: Rosai and ackerman's surgical pathology. 9th ed. Philadelphia, USA: Elsevier; 2004. p. 1764-87.
2. Sarjadi, Trihartini P. Cancer registration in Indonesia. In: IARC supplement. Asian pacific j cancer prev, Vol 2.p. 21-24.
3. Sarjadi, Trihartini P. Mapping kanker di Semarang dan Sekitarnya. In: Media medika Indonesiana, vol 36, No. 2. Semarang: FK UNDIP dan IDI Wilayah Jateng; 2001.p. 87-92.
4. Badan registrasi kanker perhimpunan dokter spesialis patologi anatomi. Kanker di Indonesia tahun 2001 data histopatologik. Yayasan Kanker Indonesia: Direktorat jenderal pelayanan medik departemen kesehatan RI.
5. Kumar V, Abbas, Fausto AK. Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier Saunders; 2005. p 26-32, 89-91,812-13, 880-881, 956-59, 1129-38.
6. Bai M, Agnantis N, Kamina S, Demou A, Zagorinakou P, Katsaraki A et al P. In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. Breast cancer res 2001; 3: 276-83.
7. Liu S, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their Association with survival in breast cancer. Clin cancer res 2001 jun 7; 1716-23.
8. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. BMJ 2001 jun 23;322:1528-32.
9. Soini Y, Pääkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am J Pathol. 1998; 153:1041-53.
10. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, et al. The Cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a

new kind of cell cycle-maintaining proteins. J cell biol 1993 Nov; 123(3): p 513-22.

11. Puay HT, Boon HB, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. Modern Pathol (2005) 18 2004 Nov 19: 374-81.
12. Breast center pathology Laboratory Services / Resources-Clinical Prognostic Biomarkers - Ki67 Proliferation Index. University of New Castle Upon Tyne. Copyright 1997-2007. Available from:
<http://www.breastcenter.tmc.edu/research/cores/path/services/ki67.htm>
13. Service/Resources – clinical prognostic biomarker. Breast cancer pathol laboratory. 2007. Baylor College of Medicine. Available from:
<http://www.breastcenter.tmc.edu/research/cores/path/services/biomarkers.htm>
14. Yang L, Cao Z, Yan H, and Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. Cancer Res 63, 2003 Oct 15: 6815-24.
15. Dowsett M, Archer C, Assersohn L, Gregory LK, Ellis PA, Salter J, et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. Endocrine-Related Cancer 1999; 6:25-28.
16. Alpinia galanga, From Wikipedia, the free encyclopedia, from :
http://en.wikipedia.org/wiki/Alpinia_galanga
17. Rosmarilin H. Anti-cancer activity of local alpinia galangal L(SW) rhizome extracts on cancer cell line of human and mice transplanted with primary tumor cell. USU repository 2006 (cited 2007 feb 14). Available from:
<http://library.usu.ac.id/download/fp/D0300608.pdf>
18. Sinaga E. Alpinia galanga (L). Willd. Erna Sinaga (Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat UNAS/P3TO UNAS) (cited 2007 feb 16). Availablefrom:

http://iptek.apjii.or.id/artikel/ttg_tanaman_obat/unas/Lengkuas.pdf

19. Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Kataoka S, Muraoka O, Yoshikawa M. Inhibitor of nitric oxide production from the rhizomes of alpinia galanga: structures of new 8-9' linked neolignans and sesqueneolignan. Pharmaceutical society of japan 2005 jan 5; accepted February 21, 2005 (cited 2007 jan 16).
Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/53/6/625/_pdf
20. Matsuda H, Morikawa T, Managi H and Masayuki Y. Antiallergic principles from alpinia galangal: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation (cited 2007 jan 16). Available from: URL:
<http://www.medscape.com/medline/abstract/12951092?prt=true>
21. Murakami A, Shigemori T and Ohigashi H. Zingiberaceous and citrus Constituents, 1'-Acetoxychavicol acetate, zerumbone, auraptene, and nobiletin, suppress lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 murine macrophages through different modes of action. Am Society for Nutr. 2005 (cited 2007 jan 16).
Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/135/12/29875>
22. Jantan, Ibrahim, Ahmad, Fasihuddin, Said A. Constituents of the Rhizome and Seed Oils of Greater Galangal Alpinia galangal (L) Willd. from Malaysia. Journal of Essential Oil Research: JEOR, May/Jun 2004. Available from:
http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200405/ai_n9452020
23. Zaeoung S, Plubrukarn A, Keawpradub N. Cytotoxic and free radical scavenging activities of zingiberaceous rhizomes. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2005, 27(4):799-812.
24. Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from hyptis suaveolens and alpinia galangal growing in northern thailand. Departement of pharmaceutical sciences, faculty of pharmacy, Chiang Mai University 50200, Thailand (cited 2007 des 12). Available from:
http://cmuj.chiangmai.ac.th/cmujvol6_1/One%20Chapter/31-42.pdf

25. Moffatt J, Hashimoto M, Kojima A, Kennedy DO, Murakami A, Koshimisu K, et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis* 2000; 21(12): 2151-57.
26. Ito K, Nakazato T, Ming JX, Yamada T, Hozumi N, Murakami A, et al. 1'-Acetoxychavicol acetate is a novel nuclear κ B inhibitor with significant activity against multiple myeloma *In vitro* and *In vivo*. *Cancer res* 2005 may 15; 65.(cited 2007 mar 16)

Available from : <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/65/10/4417>
27. Pecorico L. Molecular biology of cancer, mechanism, targets and therapeutics. New york: Oxford university press inc; 2005: p.4-9.
28. Macdonald F, Ford C.H.J & Casson A.G. Molecular biology of Cancer, 2nd Ed. London and New York: Garland science/BIOS scientific; 2004.p141-151.
29. Science. Molecular of the Year. Vol. 258, 1992. p1853-2008.
30. Alane T. Koki, PhD, and Jaime L. Masferrer, PhD, Celecoxib. A Specific COX-2 Inhibitor with Anticancer Properties, March/April 2002; Vol 9(2).
31. Rajesh L. Thangapazham, Anuj Sharma and Radha K. Maheshwari, Multiple Molecular Targets in Cancer Chemoprevention by Curcumin. *AAPS Journal*.2006; 8(3): E443-E449(cited 2007 mar 16). Available from: URL: <http://www.aapsj.org/view.asp?art=aapsj080352>
32. Fattaneh A. Tavassoli & Peter Devilee, Pathology & Genetics, Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003;p10-19
33. Hoque A, David G, Menter, Aysegul A, Sahim, Nour Sneige, and Scott M. Lippman. No Increased Ki-67 expression in ductal carcinoma in situ associated with invasive breast cancer 2001 feb. 16. 153-154.
34. Ki-67 (Biology), From Wikipedia, the free encyclopedia (cited 2007 mar 16), from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Ki-67_\(Biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Ki-67_(Biology))
35. Puay HT, Boon HB, George Y, Selvarajan S, Patrick T, Jeanie W, Chee HL, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with

transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Modern Pathol* 2005; 18:374-381.

36. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J pathol* 1991 April; 138(4).
37. Masaru A, Mari Y, Hiroaki W, Hiroshi A, Kimiyoshi H, Kiyotaka Y. Immunohistochemical detection of Ki-67 in replicative smooth muscle cell of rabbit carotid arteries after ballon denudation. *Stroke* 1995;26:2328-32.
38. Byrne RJ, Caceres CA, Calatayud JB, Calne RY, Corbin JE, Corman PA et al. Tumour transplantation. In: Gay William I. *Methods of animal experimentation*; Vol 2. New york. Academic press INC;1965: 171-213.
39. Ozluk V, Tuzlali S, Yavuz E, Derin D, Asoğlu O, Igci A et al. Primary angiosarcoma of the breast: Is Ki-67 proliferation index related to histologic grade? Does steroid hormone receptor expression play a role in the frequency of coexistent pregnancy. *Meme sagligi dergisi* 2006 Cilt: 2 Sayt: 3.

Available from: <http://www.moffitt.org/moffittapps/ccj/v9s2/pdf/28.pdf>
40. Burcombe R, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F, et al. Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer.

Breast Cancer Res 2006;p1-10. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/pdf/bcr1508.pdf>
41. Lyzigubov V, Khozhaenko Y, Usenko V, Antonkuk S, Ovcharenko G, Tikhonkova I et al. Immunohistochemical analysis of Ki-67, PCNA and S6K1/2 expression in human breast cancer. *Exp Oncol* 2005;27(2):141-144.
42. Sudiana IK. Pewarnaan apoptosis. In: *Teknologi Ilmu Jaringan Dan Imunohistokimia*. Jakarta: Sagung Seto;2004: p47-9.
43. Aggarwal B, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer.

Available from : http://www.geocities.com/agnihotrimed/Editorial_jul-dec2007.htm

44. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines (WHO/WPRO;1993:94pages),

Available from: <http://www.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/4.6.html>

45. Armed Force Institute of Pathology. Tissue processing: Dehydration, clearing, and infiltration In: Edna BP, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. Laboratory methods in histotechnology. Washington: Am regist pathol;1994.p 29-30.
46. Li. R, Heydon K, Hammond ME, Grignon DJ, Roach M, Wolkov HB et al, Ki-67 staining index predicts distant metastasis and survival in locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy. Clin cancer Res 2004 jun 15;Vol.10: 4118-4124.
47. P Lipponen. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. Endocrine-Related Cancer 1999; 6: 13-16.
48. Allred DC. Scoring immunostained slides. Modern Pathol: 1998;11(2):155-168.
49. J. Michael Dixon, Fres, Neoadjuvant anastrozole trial, BCU 4/2003 (cited 2007 mar 16), Available from:
<http://www.breastcancerupdate.com/bcu2003/4/Dixon.htm>
50. San Antonio Breast Cancer 2, 27th annual. Controversies in Her2 and estrogen Receptor testy (cited 2007 mar 16).
Available from: <http://www.breastcancerupdate.com/sanantonio/2004/sa2.pdf>
51. Lefkowitz JH, Scheuer PJ. Drugs and toxins. In: Livers biopsy interpretation. 7th ed. London: Elsevier saunders; 2005. p. 125-33.
52. Kashgarian M, Fogo AB. Tubulointerstitial diseases. In: Diagnostic atlas of renal pathology. 7th ed. London: Elseviers saunders; 2005. p. 371

53. Young VB, Dangler CA, Fox JG and Schauer DB: Chronic atrophic gastritis in SCID mice experimentally infected with campylobacter fetus. Am soc for microbial 2000 april; 68(4):2110-18.
54. Lee WM. Drug induced hepatotoxicity. N Engl J Med 2003; 349:474-85.
55. Sang KJ, Hu X, Yuen PS, Aslamkhan AG, Pritchard JB, Dear JW et al. Delayed DMSO administration protects the kidney from mercuric chloride-induced injury. J Am Soc Nephrol 2004; 15:2648-2654.
56. Hisashi M, Yutana P, Toshio M, Momotaro O, Masayuki Y. Gastroprotective effects of phenylpropanoids from rhizomes of *Alpinia galangal* in rats: structural requirement and mode of action. Europ J pharmacol 2003; 471:59-67.
57. Jensen MM, Jorgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by F-FDG-microPET or external caliper. BMC Medical Imaging 2008,8:16doi:10.1186/1471-2342-8-16.(cited 2007 apr 15)
Available from : URL: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2342-8-16.pdf>
58. Gall LC, Bellahcene A, Bonnelye E, Gasser JA, Castronovo V, Green J et al. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer-induced osteolysis and skeletal tumor burden. Available from :URL:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/67/20/9894>
59. Cameron IL, Lu ZS, Short N, Hardman WE, Williams CD. Therapeutic electromagnetic field (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. Cell Cancer International 2005,5:23doi:10.1186/1475-2867-5-23. Available from :URL:
<http://www.cancerci.com/content/5/1/23>

